



**Séquençage du génome du parasite intestinal  
Blastocystis sp. (ST7) : vers une meilleure  
compréhension des capacités métaboliques d'organites  
apparentés aux mitochondries chez ce microorganisme  
anaérobie**

Michaël Roussel

► **To cite this version:**

Michaël Roussel. Séquençage du génome du parasite intestinal *Blastocystis* sp. (ST7) : vers une meilleure compréhension des capacités métaboliques d'organites apparentés aux mitochondries chez ce microorganisme anaérobie. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22164 . tel-00678598

**HAL Id: tel-00678598**

**<https://theses.hal.science/tel-00678598>**

Submitted on 13 Mar 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°D.U. : 2164

**Université Blaise Pascal**

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,  
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**

**N° d'ordre : 557**

# **Thèse**

**pour obtenir le grade de DOCTEUR D'UNIVERSITE**

**Spécialité : Microbiologie**

**Présentée et soutenue publiquement par**

**ROUSSEL Michaël**

**le 27 septembre 2011**

**Séquençage du génome du parasite intestinal *Blastocystis* sp. (ST7) :  
vers une meilleure compréhension des capacités métaboliques  
d'organites apparentés aux mitochondries chez ce microorganisme  
anaérobie**

**Directeur de la thèse :**

**M. DELBAC Frédéric**, Professeur, Université Blaise Pascal

**Membres du jury :**

**M. BRINGAUD Frédéric**, DR CNRS, RMSB, Université Bordeaux Segalen (Bordeaux)

**M. HIRT Robert**, Senior Lecturer, ICAMB, Université de Newcastle (Newcastle)

**Mme. DARFEUILLE-MICHAUD Arlette**, Professeur, Université d'Auvergne (Clermont-Ferrand)

**M. VIVARES Christian**, Professeur émérite, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand)

**M. VISCOGLIOSI Eric**, CR CNRS, Institut Pasteur Lille, Université Lille Nord, (Lille)

LMGE, UMR-CNRS 6023  
Equipe Interactions hôtes-parasites  
Université Blaise Pascal  
24 Avenue des Landais, 63177 Aubière cedex



*A mes parents,*

*Pour m'avoir encouragé et soutenu pendant toutes ces années,  
Je vous dédie cette thèse car c'est grâce à vous que je la soutiens aujourd'hui.*

*Soyez certains de toute ma reconnaissance, admiration et affection*

*A tous ceux qui me sont chers*





# Remerciements

*Je remercie sincèrement,*

*Messieurs les Docteurs Frédéric Bringaud et Robert Hirt d'avoir aimablement accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je suis fier de vous compter parmi mes juges et vous assure ma reconnaissance et mon respect.*

*Madame le Professeur Arlette Darfeuille-Michaud, d'avoir aimablement accepté de participer à ce jury, et de m'avoir permis de terminer ma thèse en m'acceptant sur un poste d'ATER.*

*Monsieur Christian Vivares, pour m'avoir accompagné et soutenu en Master 2 et durant le concours de l'attribution des bourses de thèse, pour ses conseils avisés. Merci !*

*Monsieur Eric Viscogliosi, pour sa collaboration et son engagement dans nos travaux communs sur Blastocystis. Nous ne sommes pas au bout de nos surprises Eric !*

*Monsieur le professeur Frédéric Delbac, pour m'avoir suivi tout au long de cette thèse, pour sa disponibilité, sa confiance, son écoute, son soutien et ses conseils. Cela a été un plaisir de travailler dans ton équipe et sous ta direction Fred. Trouve ici toute ma gratitude et mon respect sincère.*

*Je tiens à remercier,*

*Tous ceux de l'équipe « Interactions hôtes-parasites » et du LMGE, pour leur accueil, leurs conseils, et leur gentillesse.*

*Je tiens également à remercier tous ceux qui ont participé à ce travail.*



## ROUSSEL Michaël

Séquençage du génome du parasite intestinal *Blastocystis* sp. (ST7) : vers une meilleure compréhension des capacités métaboliques d'organites apparentés aux mitochondries chez ce microorganisme anaérobie

### Résumé

*Blastocystis* sp., est un straménopile parasite anaérobie fréquemment rencontré dans le tractus gastro-intestinal de l'homme et de divers animaux. Ce microorganisme, parfois responsable de désordres digestifs aigus, pourrait conduire à des troubles fonctionnels intestinaux tels que le syndrome de l'intestin irritable (IBS). Le génome de *Blastocystis* sp., qui a fait l'objet d'un projet de séquençage en collaboration avec le Génoscope d'Evry, nous a permis de caractériser le plus petit génome de straménopile séquencé à ce jour (18,8 Mpb), avec une capacité codante de 6020 gènes. L'acquisition de nombreux gènes par transferts horizontaux est une caractéristique majeure de ce génome, qui montre d'abondants réarrangements génomiques.

Bien qu'évoluant en anaérobiose, *Blastocystis* sp. possède des organites morphologiquement proches des mitochondries, appelés mitochondrion-like organelles (MLOs). Nous avons montré que ces organites comportaient un génome circulaire de type mitochondrial de 29,27 kpb, mais dépourvu des gènes codant pour les cytochromes. Des analyses *in silico* nous ont permis de caractériser le protéome des MLOs (365 protéines), conduisant à l'établissement d'un modèle prédictif des voies métaboliques associées à ces organites, avec notamment une chaîne respiratoire limitée aux complexes I et II. Nous avons ainsi montré que les MLOs présentent des caractères communs aux mitochondries anaérobies et aux hydrogénosomes (présence d'une PFOR et d'une hydrogénase à fer), suggérant que *Blastocystis* sp. comporte des mitochondries anaérobies modifiées, qui résulteraient d'une adaptation du parasite à son environnement.

Par ailleurs, la prédiction du sécrétome de *Blastocystis* sp. révèle la présence de facteurs de virulence potentiels, pouvant être impliqués dans l'altération de l'épithélium intestinal et le contournement du système immunitaire de l'hôte.

**Mots-clefs** : génome, analyse *in silico*, mitochondrie anaérobie, hydrogénosome, sécrétome

### Abstract

*Blastocystis* sp. is a highly prevalent anaerobic eukaryotic stramenopile parasite found in the intestinal tract of humans and various animals. This microorganism, sometimes associated with acute intestinal disorders, could be responsible for functional intestinal disorders such as the irritable bowel syndrom (IBS). As part of a collaborative sequencing project with the Genoscope (CEA Evry, France), we were able to characterize the smallest stramenopile genome sequenced to date (18.8 Mbp) with a 6020 genes coding capacity. The gain of many genes through horizontal gene transfer is a major characteristic of this genome, which shows extensive genomic rearrangements.

Despite the anaerobic nature of *Blastocystis* sp., this eukaryote harbours nevertheless mitochondrion-like organelles (MLOs). We have shown that these organelles have a 29.27 kbp mitochondrial-type circular genome that lacks cytochrome coding genes. *In silico* analysis allowed us to predict the MLOs proteome (365 proteins), with the subsequent predictive model of the metabolic pathways associated with these organelles, including an electron transport chain (ETC) restricted to complex I and II. We have shown that MLOs shared common characteristics with anaerobic mitochondrion and hydrogenosomes (presence of a PFOR and an iron-hydrogenase), which could mean that *Blastocystis* sp. harbours modified anaerobic mitochondrion that resulted from the parasite adaptation to its anaerobic environment.

In addition, *Blastocystis* sp. secretome prediction reveals the presence of potential virulence factors, which could be involved in the degradation of the intestinal epithelium as well as the host immune system bypass.

**Key-words** : genome, *in silico* analysis, anaerobic mitochondria, hydrogenosome, secretome



# SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS .....	1
INTRODUCTION.....	2

## **CHAPITRE I - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

I. <i>BLASTOCYSTIS</i> SP., UN PARASITE INTESTINAL POLYMORPHE A LA DIVERSITE GENETIQUE COMPLEXE .....	5
A. TAXONOMIE ET DIVERSITE GENETIQUE DE <i>BLASTOCYSTIS</i> SP.....	5
A.1 UNE IDENTIFICATION LABORIEUSE.....	5
A.2 UN STRAMENOPILE PEU COMMUN .....	6
A.3 DIVERSITE GENETIQUE ET CLASSIFICATION .....	8
A.3.1 Une diversité génétique complexe .....	9
A.3.2 Spéciation et classification .....	11
B. LA BIOLOGIE DE <i>BLASTOCYSTIS</i> SP.....	14
B.1 UN ORGANISME POLYMORPHE .....	14
B.1.1 La forme vacuolaire.....	15
B.1.2 La forme granulaire .....	17
B.1.3 La forme amiboïde .....	17
B.1.4 La forme kystique .....	19
B.2 CYCLE DE VIE ET MODE DE CONTAMINATION .....	20
B.2.1 Un cycle de vie encore hypothétique .....	20
B.2.2 L'eau comme source de contamination.....	22
B.3 CULTURE EN LABORATOIRE.....	23
B.4 IDENTIFICATION, EPIDEMIOLOGIE ET PREVALENCE .....	25



B.4.1	L'avènement du diagnostic moléculaire .....	25
B.4.2	Epidémiologie et prévalence.....	26
B.5	ASPECTS CLINIQUES DE <i>BLASTOCYSTIS</i> SP. ....	28
B.6	<i>BLASTOCYSTIS</i> SP., UN MICROORGANISME PATHOGENE ?.....	30
B.6.1	Identification de facteurs de virulence potentiels in vitro.....	30
B.6.2	Modèles animaux et physiopathologie .....	31
C.	TRAITEMENTS DE LA BLASTOCYSTOSE .....	33

## II. MITOCHONDRIES ET ORGANITES APPARENTES : TEMOIGNAGE

	DU CARACTERE EVENEMENTIEL ET ADAPTATIF DE L'EVOLUTION.....	35
A.	ORIGINE ENDOSYMBIOTIQUE DE LA MITOCHONDRIE .....	35
B.	LA MITOCHONDRIE : UN ORGANITE POLYMORPHE AUX CAPACITES METABOLIQUES MULTIPLES.....	38
B.1	LA MITOCHONDRIE AEROBIE « TEXTBOOK » .....	38
B.1.1	Une morphologie singulière.....	38
B.1.2	Un Rôle métabolique essentiel .....	39
B.1.3	Le génome mitochondrial : évolution et diversité.....	41
B.2	HETEROGENEITES MORPHOLOGIQUES ET METABOLIQUES.....	47
B.2.1	Particularités ultrastructurales des mitochondries des Apicomplexes et des Trypanosomatidés .....	47
B.2.2	Originalité du métabolisme mitochondrial de Plasmodium .....	51
B.3	MITOCHONDRIE ET ENVIRONNEMENT ANAEROBIE.....	54
B.3.1	La respiration des mitochondries anaérobies.....	55
B.3.2	Succinate déshydrogénase versus fumarate réductase .....	57
C.	HYDROGENOSOMES ET MITOSOMES : DES ORGANITES APPARENTES AUX MITOCHONDRIES .....	60





C.1 LES HYDROGENOSOMES, DES ORGANITES PRODUCTEURS D'HYDROGENE .....	60
C.1.1 Morphologies .....	60
C.1.2 Origine et description.....	61
C.1.3 Distinctions métaboliques.....	65
C.1.4 Particularité des protéines hydrogénosomales de <i>Trichomonas vaginalis</i> ....	68
C.2 LES MITOSOMES .....	70
C.2.1 Morphologies .....	71
C.2.2 Capacité métabolique des mitosomes .....	71
C.3 MITOCHONDRIE <i>VERSUS</i> HYDROGENOSOME : UNE DISTINCTION EST-ELLE NECESSAIRE ? .....	73
D. L'HISTOIRE DES PROTEINES CHAPERONNES DANS L'EVIDENCE PHYLOGENETIQUE D'UN ANCETRE MITOCHONDRIAL PRIMITIF .....	78

## **CHAPITRE II - RESULTATS EXPERIMENTAUX**

I. SEQUENÇAGE DU GENOME COMPLET DE <i>BLASTOCYSTIS</i> SP. ....	81
A. LA GENOMIQUE, POUR UNE MEILLEURE CONNAISSANCE DES ORGANISMES .....	81
A.1 LA GENOMIQUE EN PARASITOLOGIE.....	82
A.2 DONNEES GENOMIQUES ET IDENTIFICATION DE MOLECULES ANTIPARASITAIRES .....	83
A.3 ANNOTATION FONCTIONNELLE ET RECONSTRUCTION METABOLIQUE .....	85
A.4 LORSQU'UN SEUL GENOME NE SUFFIT PAS : LA GENOMIQUE COMPARATIVE.....	87
B. ARTICLE 1 – SEQUENÇAGE DU GENOME COMPLET DE <i>BLASTOCYSTIS</i> SP. ST7 .....	88
II. ARTICLE 2 – SEQUENCE COMPLETE DU GENOME CIRCULAIRE DU MLO DE <i>BLASTOCYSTIS</i> SP. ST7 .....	99
III. ARTICLE 3 – LES ORGANITES APPARENTES AUX MITOCHONDRIES (MLOS) DE <i>BLASTOCYSTIS</i> SP. PRESENTENT DES CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES SIMILAIRES AUX MITOCHONDRIES .....	103



### **CHAPITRE III - CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

I. PROPRIETES DU GENOME DE <i>BLASTOCYSTIS</i> SP. ST7 .....	126
A. CARACTERISTIQUES GENERALES .....	126
B. DUPLICATIONS ET REARRANGEMENTS.....	127
C. ACQUISITION DE GENES PAR TRANSFERT HORIZONTAL ET RELIEUES ENDOSYMBIOTIQUES .....	128
C.1 POUR UNE MEILLEURE ADAPTATION A L'ENVIRONNEMENT INTESTINAL .....	128
C.2 LE GENOME DE <i>BLASTOCYSTIS</i> SP. COMPORTE DE MANIERE SURPRENANTE DES GENES D'ORIGINE CHLOROPLASTIQUE.....	129
II. LE MLO DE <i>BLASTOCYSTIS</i> SP. SEMBLE ETRE UNE MITOCHONDRIE ANAEROBIE MODIFIEE .....	130
A. LES MLOS PRESENTENT UN GENOME TYPIQUEMENT MITCHONDRIAL .....	130
B. UN INTERMEDIAIRE ENTRE MITOCHONDRIE ANAEROBIE ET HYDROGENOSOME .....	131
III.LA PREDICTION DU SECRETOME DE <i>BLASTOCYSTIS</i> SP. REVELE LA PRESENCE DE FACTEURS DE VIRULENCE .....	135

### **CHAPITRE IV - ANNEXES**

I. ANNEXE 1 – ETUDE D'UN FACTEUR DE VIRULENCE POTENTIEL (LEGUMAÏNE) CHEZ <i>BLASTOCYSTIS</i> SP.....	139
II. ANNEXE 2 .....	145

### **CHAPITRE V – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



# Liste des abréviations

<b>AOX</b>	Alternative Oxydase	<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>ASCT</b>	Acétate:Succinate-CoA transférase	<b>OXA</b>	Insertase/export machinery of the
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection		inner membrane
<b>BCKDH</b>	Branched-Chain Keto-Acid Dehydrogenase	<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>CoA</b>	Coenzyme A	<b>PCR-RFLP</b>	PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>DHODH</b>	Dihydroorotate déshydrogénase	<b>PDH</b>	Pyruvate Déshydrogénase
<b>EST</b>	Expressed Sequence tag	<b>PFGE</b>	Pulsed field gel electrophoresis
<b>FRD</b>	Fumarate réductase	<b>PFL</b>	Pyruvate Formate Lyase
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus	<b>PFOR</b>	Pyruvate:Ferrédoxine Oxydoréductase
<b>Hsp60</b>	Heat Shock Proteins 60	<b>PGK</b>	Phosphoglycérate Kinase
<b>Hsp70</b>	Heat Shock proteins 70	<b>PK</b>	Pyruvate Kinase
<b>IBD</b>	Irritable Bowel Disease	<b>PNO</b>	Pyruvate:NADP+ Oxydoréductase
<b>IBS</b>	Irritable Bowel Syndrome	<b>PSM</b>	Poste de Sécurité Microbiologique
<b>kDa</b>	kilodalton	<b>RAPD</b>	Random Amplification of Polymorphic DNA
<b>Kpb</b>	Kilo-paires de bases	<b>SAM</b>	Sorting and Assembly Machinery
<b>MET</b>	Microscopie Electronique à Transmission	<b>SCS</b>	Succinyl-CoA Synthétase
<b>MIA</b>	Mitochondrial Intermembrane space Assembly	<b>SDH</b>	Succinate Déshydrogénase
<b>MLOs</b>	Mitochondrion-Like Organelles	<b>SIDA</b>	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
<b>Mpb</b>	Méga-paires de bases	<b>STK</b>	Succinate thiokinase
<b>MPP</b>	Mitochondrial Processing Peptidase	<b>STS-PCR</b>	Sequence Tagged Site-PCR
<b>NaR</b>	Nitrate Réductase	<b>TIM</b>	Translocase of the Inner Membrane
<b>NiR</b>	Nitrite Réductase	<b>TOM</b>	Translocase of the Outer Membrane



# Introduction

L'apparition de maladies émergentes ou ré-émergentes, causées par certains eucaryotes pathogènes comme les protozoaires, constitue actuellement un des grands enjeux de santé publique. *Blastocystis* sp., considéré comme un protozoaire parasite émergent, est retrouvé dans le tractus intestinal de l'homme mais aussi de divers animaux. Il est responsable d'infections cosmopolites fréquentes. Ce microorganisme est à ce jour le parasite le plus fréquemment rencontré dans les selles chez l'homme, et présente une prévalence beaucoup plus élevée que d'autres protozoaires intestinaux tels que *Giardia*, *Entamoeba* ou *Cryptosporidium* (Boorom *et al.*, 2008). *Blastocystis* sp. est également un des rares parasites entériques à dépasser une prévalence de 5% dans la population générale des pays développés (Tan, 2008), celle-ci pouvant atteindre 60% dans les pays en développement (Saksirisampant *et al.*, 2006). Des études indiquent que cette prévalence peut être supérieure à 40% chez des individus atteints de troubles fonctionnels intestinaux, comme le syndrome de l'intestin irritable (IBS) (Dogruman-Al *et al.*, 2010). Ce parasite est de plus fréquemment rencontré chez des patients immunodéprimés porteurs par exemple du VIH, ou présentant des cancers (Kurniawan *et al.*, 2009). La contamination par *Blastocystis* sp. semble être facilitée par des contacts rapprochés avec les animaux (Parkar *et al.*, 2010; Yoshikawa *et al.*, 2009), suggérant une contamination d'origine zoonotique. Une telle prévalence dans la population humaine conduit naturellement à se demander quel est l'impact de ce parasite sur la santé humaine. L'intérêt croissant pour ce parasite a conduit à la création d'une fondation aux Etats-Unis (<http://www.bhomcenter.org/>), et à une importante augmentation du nombre de publications scientifiques ces dernières années. La pathogénie de *Blastocystis* sp. est cependant controversée, principalement du au fait que ce parasite peut être retrouvé chez des patients symptomatiques mais aussi chez des patients asymptomatiques (Dogruman-Al *et al.*, 2008; Souppart *et al.*, 2009). Néanmoins, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* montrent que l'infection par *Blastocystis* sp. peut être associée à des complications gastrointestinales, pouvant jouer un rôle dans les syndromes





de type IBS (Boorom *et al.*, 2008; Tan, 2008). Tan et ses collaborateurs ont ainsi montré *in vitro* que *Blastocystis* sp. est capable de sécréter certains facteurs de virulence, comme des protéases, pouvant conduire à une altération de l'épithélium intestinal de l'hôte (Puthia *et al.*, 2008), et à une destruction des immunoglobulines sécrétoires (Puthia *et al.*, 2005). Par ailleurs, une considérable hétérogénéité moléculaire des isolats de *Blastocystis* sp. a été observée, avec l'identification de 9 sous-types différents (ST1 à ST9) présents chez l'homme (Stensvold *et al.*, 2007b). Malgré toutes ces études, peu de données sont disponibles sur la biologie et le cycle de vie de ce straménopile parasite.

Le premier objectif de mon travail a été de contribuer au projet de séquençage du génome de *Blastocystis* sp. ST7, afin d'apporter des données sur la structure du génome de ce straménopile parasite, ses capacités métaboliques, et son pouvoir pathogène potentiel. Le deuxième objectif était de caractériser, par des approches *in silico* et expérimentales, les organites à double membrane (MLOs) qui caractérisent ce protozoaire anaérobie. Les résultats sont présentés sur articles, précédés d'une revue bibliographique portant sur la découverte et la biologie de *Blastocystis*, et sur les mitochondries et les organites apparentés. Les résultats sont ensuite discutés. Enfin, la publication réalisée en marge de ce travail, concernant l'étude d'un facteur de virulence potentiel de *Blastocystis* sp. est annexée à la fin de ce manuscrit.



# **Chapitre I**

## **Revue bibliographique**

*« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information. »*

*Albert Einstein*



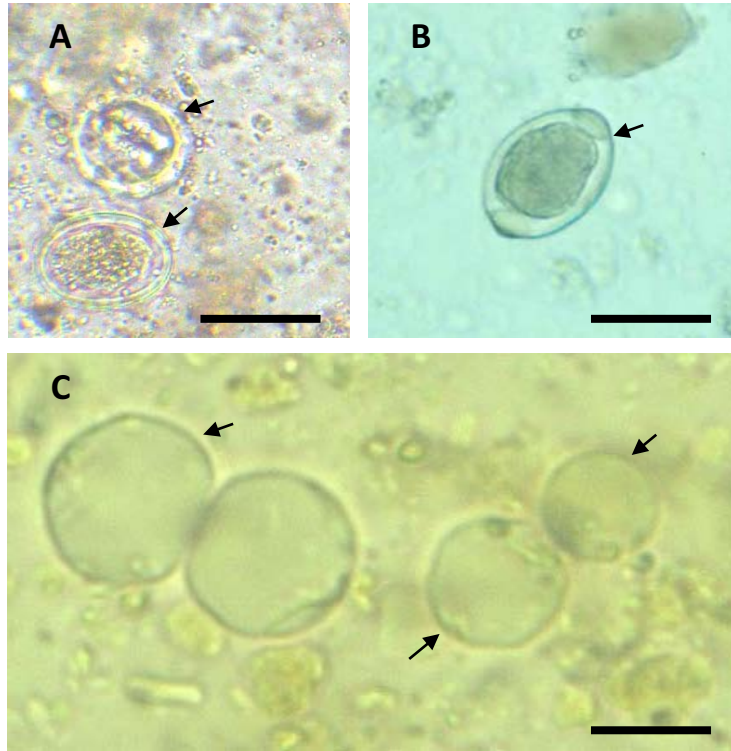
# **I. *Blastocystis* sp., un parasite intestinal polymorphe à la diversité génétique complexe**

## **A. Taxonomie et diversité génétique de *Blastocystis* sp.**

### **A.1 Une identification laborieuse**

Avant de nous plonger dans la classification taxonomique et la diversité génétique de *Blastocystis* sp., il est à mon sens important de revenir sur l'histoire de la découverte de cet intrigant parasite. Son histoire débute par une grande effervescence autour de l'observation de cet organisme (dès 1849), qui fait souvent état d'une importante confusion à l'époque. L'intérêt pour ce microorganisme va progressivement décliner, avant de susciter à nouveau la curiosité de certains scientifiques, comme celle du docteur Charles Zierdt (en 1967) qui va passer près de 20 ans de sa vie à l'étude de *Blastocystis*. Ce scientifique affirmait que « les difficultés empêchant le développement ordonné des connaissances sur *Blastocystis hominis* étaient largement la faute de l'organisme lui-même » (Zierdt, 1991). Il faut effectivement avouer que du fait de sa morphologie, ce parasite peut être confondu avec bon nombre de cellules ou d'organismes ; c'est d'ailleurs cette principale difficulté qui a semé le doute et la confusion dans les travaux des observateurs de cet organisme. En effet, comment peut-on apporter des connaissances sur un organisme sans certitudes concernant son identité ?

La première observation d'entités pouvant correspondre à ce microorganisme que l'on nommera plus tard *Blastocystis hominis*, est réalisée par Swayne (Swayne, 1849) et Brittan (Brittan, 1849) lors de leurs études sur l'épidémie de choléra qui a eu lieu à Londres en 1849. Pour eux, ces entités retrouvées dans les diarrhées de patients infectés sont la cause du choléra et sont désignées sous le nom de « cholera bodies » par Swayne et de « annular cells » par Brittan. Il n'est pas à exclure que Swayne et Brittan aient pu observer des cellules de *Blastocystis* (encore méconnu à l'époque) dans les selles de ces patients, mais



**Figure 1. Observations coprologiques d'*Ascaris lumbricoïdes*, de *Trichuris trichiura* et de *Blastocystis sp.*** Les œufs (flèches) d' *A. lumbricoïdes* (A) et de *T. trichiura* (B) peuvent parfois être confondus avec des cellules de *Blastocystis sp.* (C), compte tenu de leur morphologie et de leur taille. Echelle : 20 μm. Sources : (A, B) <http://www.lookfordiagnosis.com>, (C) photo réalisée par Philippe Poirier (UMR CNRS 6023, LMGE).

il semblerait que les dessins d'observations réalisés correspondent à des ovules d'*Ascaris lumbricoïdes* ou de *Trichuris trichiura* (Figure 1).

Durant les années suivantes, l'observation de cet énigmatique parasite va être interprétée de façons très diverses. Il sera notamment confondu avec des cellules végétales ou des cellules en dégénérescence, probablement en raison des faibles performances des microscopes de l'époque. *Blastocystis* a par exemple été décrit à tort, comme un parasite responsable de certaines hépatopathies chez l'homme, de par sa ressemblance morphologique avec des hépatocytes dégénérés. Le nombre d'observations de *Blastocystis* se multiplie pourtant, non seulement chez l'homme, mais aussi chez certains animaux comme les serpents, les mouches, les rongeurs, ou encore les blattes, mais les auteurs de ces observations sont largement ignorés.

Aux début du XX<sup>ème</sup> siècle, Bensen, Alexieff, Swellingrebel, pour n'en citer que certains, pensaient que *Blastocystis* était la forme kystique des flagellés *Trichomonas intestinalis*, *Chilomastix mesnili* ou *Endolimax nana* (Zierdt, 1991). Alexieff reconnaît cependant son erreur et donne le nom de *Blastocystis enterocola* à cet organisme, qui est pour lui une levure. En 1912, Brumpt remplace l'épithète *enterocola* par *hominis* pour les organismes retrouvés dans les selles de patients humains (Brumpt, 1912).

Il aura donc fallu attendre près de 60 ans pour que ce microorganisme soit considéré comme un organisme autonome et qu'il ait enfin une identité. Le nom de *Blastocystis hominis* demeure maintenant le nom utilisé dans la littérature actuelle, bien que la notion d'espèce (nous le verrons dans la suite de cette introduction bibliographique) soit parfois confuse.

## **A.2 Un straménopile peu commun**

*Blastocystis hominis* est donc à l'époque classé parmi les champignons. De nombreuses publications vont se succéder, classant ce parasite dans différents genres de levure, tels que *Schizosaccharomyces* ou *Saccharomyces*. Pour Zierdt, le fait de rapprocher *B.*



Characteristic	Yeast	<i>B. hominis</i>
Strict anaerobe	No	Yes
No growth on fungal or bacteriological media	No	Yes
Growth on media developed for intestinal protozoa	No	Yes
No growth on surface of solid media	No	Yes
Requires presence of bacteria for growth; axenic growth achieved slowly under carefully controlled conditions	No	Yes
Capable of ingesting bacteria and other particulate matter	No	Yes
Cultures die in 2–3 days at 22°C or overnight at 4°C	No	Yes
No growth below 33°C, but cell death at 30°C	No	Yes
Optimal growth at 37°C	No	Yes
Optimal growth at neutral pH	No	Yes
No growth at pH 5.5	No	Yes
Resistant to 400 µg of amphotericin per ml	No	Yes
Sensitive to drugs effective against intestinal protozoa	No	Yes
No cell wall	No	Yes
Reproduction by endodyogony, schizogony, binary fission, and plasmotomy (cutting off) individual <i>B. hominis</i> from the ameba form	No	Yes
No budding	No	Yes
Supports stable bacterial endosymbiont (an obligate mutualism)	No	Yes
Slow-feeding pseudopods	No	Yes
Rapid locomotion pseudopods	No	Yes
Limiting membrane with micropinocytotic vesicles	No	Yes
Membrane-bound CB, a reproductive organelle, formerly called vacuole	No	Yes
Mitochondria in all cells; mitochondria show a general morphology similar to that in other protozoa, with short saccate cristae when in the resting mode	No	Yes

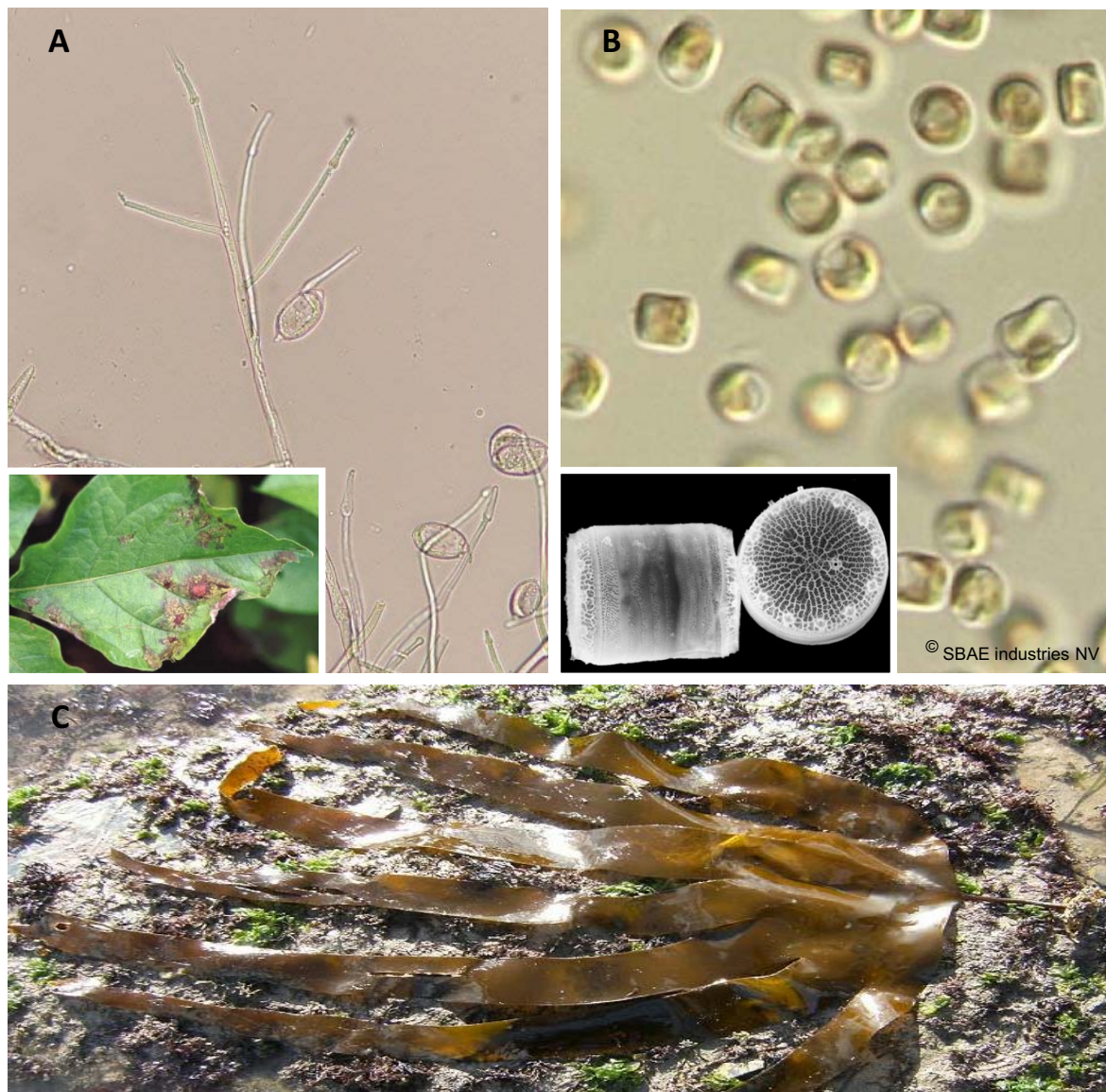
**Tableau 1. Caractéristiques utilisées pour reclasser *Blastocystis* sp. parmi les protozoaires.**

*Blastocystis* sp. ne comportent pas les mêmes propriétés physiologiques que les champignons, comme le montre cette comparaison avec une levure. D'après Zierdt, 1991.

*hominis* des levures n'était pas dénué de sens. En effet, celui-ci présente une apparence proche des levures que l'on peut observer dans des selles fraîches, et son mode de division par fission binaire peut être facilement confondu avec un mode de division par bourgeonnement (Zierdt, 1991).

Pourtant, Zierdt va démontrer pour la première fois, à travers des études morphologiques, ultrastructurales et physiologiques, le caractère de protozoaire de cette « levure intestinale » (Zierdt *et al.*, 1967). Cet organisme est en effet incapable de se multiplier dans un milieu de culture pour champignons, et demeure sensible à des molécules utilisées contre les protozoaires (métronidazole), mais résistant aux fongicides (Zierdt, 1988, 1991) (Tableau 1). En 1991, Zierdt classe ainsi *B. hominis* parmi les sporozoaires, avant de l'inclure dans la famille des sarcodines, en s'appuyant une nouvelle fois sur des observations morphologiques et ultrastructurales.

L'avènement de la systématique moléculaire, qui repose sur l'analyse et la comparaison de la séquence de certains gènes, va littéralement transformer la vision de la phylogénie classique, en apportant aux scientifiques une méthode rapide permettant de déterminer les affinités phylogénétiques des organismes. Ainsi, la comparaison de la séquence partielle du gène codant l'ARN de la petite sous-unité ribosomale (ssu rRNA) de *B. hominis* avec celle d'autres eucaryotes conclut au fait que cet organisme n'est pas monophylétique avec la levure (*Saccharomyces*), les champignons (*Neurospora*), les sporozoaires (*Toxoplasma*) ou les sarcodines (*Dictyostelium*) (Johnson *et al.*, 1989). Quelques années plus tard, Silberman et ses collaborateurs, en obtenant la séquence totale de ce gène proposent que *Blastocystis* devrait être classé parmi les straménopiles (Silberman *et al.*, 1996). Des données plus récentes, s'appuyant sur la séquence d'autres gènes, codant notamment pour une Hsp70 cytoplasmique, le facteur d'élongation 2 (EF-2), ou la sous-unité B de l'ATPase vacuolaire confirment effectivement les premiers travaux et l'appartenance de *Blastocystis* au groupe des straménopiles (Arisue *et al.*, 2002).



**Figure 2. Exemples d'organismes appartenant au groupe des straménopiles.**

Le groupe des Straménopiles comporte des organismes parasites comme l'oomycète *Phytophthora infestans* (A) qui est un parasite de plantes, mais aussi des organismes libres tels que la diatomée *Thalassiosira pseudonana* (B), ou l'algue brune *Laminaria digitata* (C).

Sources : (A) <http://www.bioimages.org.uk>, (B) <http://www.sbae-industries.com>, (C) <http://www.sb-roscoff.fr>.

Les straménopiles, ou hétérokontes, correspondent à « un assemblage complexe et hétérogène, comportant des microorganismes unicellulaires et pluricellulaires, hétérotrophes et photosynthétiques » (Tan, 2004). Ceux-ci sont caractérisés par la présence, à un moment de leur cycle de vie, d'une cellule à deux flagelles, dont l'un porte des mastigonèmes (fines digitations de la membrane du flagelle). Ce groupe très diversifié comprend des organismes libres tels que des diatomées (*Thalassiosira pseudonana*), des algues brunes (*Laminaria digitata*), ou encore des organismes parasites comme les oomycètes (*Phytophthora infestans*) (Figure 2).

Des études moléculaires montrent de manière surprenante que *Blastocystis* est phylogénétiquement proche du straménopile *Proteromonas lacertae*, un endosymbionte flagellé de l'intestin de lézards et d'amphibiens (Arisue *et al.*, 2002; Hoevers and Snowden, 2005; Noel *et al.*, 2003). Toutefois, à la différence des straménopiles, *Blastocystis* ne possédant pas de flagelle (et donc pas de mastigonème), une nouvelle classe, celle des *Blastocystae* a été spécialement créée (Cavalier-Smith, 1987).

L'appartenance de *Blastocystis* aux straménopiles s'avère donc indéniable aux vues des différentes études phylogénétiques qui ont été menées. Il faut tout de même garder à l'esprit que ce straménopile, pour le moins singulier puisqu'il est le seul à pouvoir parasiter l'homme, demeure encore un organisme énigmatique. Nous allons d'ailleurs le découvrir au cours des différents paragraphes qui vont suivre.

### **A.3 Diversité génétique et classification**

*Blastocystis hominis* est un parasite entérique humain et reste le parasite le plus fréquemment rencontré lors d'examens coprologiques parasitaires. Bien que son caractère pathogène et son rôle dans certaines complications gastro-intestinales soient encore sujet à discussion, sa prévalence varie fortement d'un pays à l'autre. De manière générale, celle-ci est relativement faible dans les pays développés comme le Japon (0,5 à 1%) (Hirata *et al.*, 2007), mais peut atteindre plus de 60% dans les pays en voie de développement comme



l'Indonésie (Pegelow *et al.*, 1997). *Blastocystis* est également retrouvé chez de nombreux animaux, comme les primates, les oiseaux, les porcs, les bovins, les amphibiens, les rongeurs, les insectes et les reptiles (Abe, 2004b; Boreham and Stenzel, 1993a). La plupart des isolats, provenant de l'homme ou de différents groupes d'animaux, sont morphologiquement similaires, que ce soit en microscopie photonique ou électronique. Quelques études évoquent l'existence de différences morphologiques entre certains isolats (Cassidy *et al.*, 1994; Stenzel and Boreham, 1996), mais il apparaît compliqué de différencier de manière claire un isolat, voire une espèce par rapport à un(e) autre, en se basant exclusivement sur des critères morphologiques. Toutefois, il est important de souligner que depuis 20 ans, un nombre grandissant de publications rapportent que le genre *Blastocystis* témoigne d'une très grande diversité génétique. De manière surprenante, une certaine hétérogénéité peut être retrouvée au sein d'un même isolat provenant d'un même hôte, alors que d'autres isolats provenant d'hôtes différents (humains ou animaux), sont similaires.

### A.3.1 Une diversité génétique complexe

Cette surprenante et importante hétérogénéité génétique a été mise en évidence par des approches protéiques et immunologiques (Boreham *et al.*, 1992; Gericke *et al.*, 1997; Mansour *et al.*, 1995; Muller, 1994), mais aussi par de nombreuses données apportées par les techniques de RAPD (Init *et al.*, 1999; Yoshikawa *et al.*, 1996; Yoshikawa *et al.*, 1998), de PCR-RFLP (Abe *et al.*, 2003a, 2003b, 2003c; Clark, 1997; Hoevers *et al.*, 2000; Rivera and Tan, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2000), de STS-PCR (Stark *et al.*, 2007; Yoshikawa *et al.*, 2004a; Yoshikawa *et al.*, 2004b; Yoshikawa *et al.*, 2009) et d'analyses caryotypiques en champ pulsé (Carbajal *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1996). Nous n'allons bien entendu pas entrer dans le détail de toutes ces études, mais voyons néanmoins quelques exemples marquants de cette diversité génétique.



Dès 1996, Yoshikawa et ses collaborateurs en analysant la diversité génétique par RAPD de quelques isolats humains et animaux, se sont aperçus que le profil d'un isolat provenant d'un patient japonais (HE87-1) et celui d'un poulet (CK86-1) étaient similaires, suggérant que l'isolat HE87-1 pourrait être d'origine zoonotique. Ces mêmes analyses ont néanmoins montré une différence totale de profil entre celui du poulet et ceux de 5 autres isolats prélevés sur des patients Singapouriens, évoquant le caractère très polymorphe du génome de *Blastocystis* (Yoshikawa *et al.*, 1996; Yoshikawa *et al.*, 1998).

Cette diversité a également été mise en évidence par l'analyse caryotypique en champs pulsé (PFGE) de différents isolats humains. Ainsi, Carbajal et ses collaborateurs (1997) ont pu montrer des différences significatives (notamment sur le nombre de chromosomes) entre les profils caryotypiques de 15 isolats de *B. hominis*, dont 11 ont pu être regroupés en 3 caryotypes distincts (Carbajal *et al.*, 1997).

Dans un souci de classer et d'identifier les différents isolats, certaines études ont utilisé une approche par PCR-RFLP, afin d'analyser les variations de la séquence du gène codant l'ARN de la petite sous-unité ribosomale (ssu rRNA) de différents isolats de *B. hominis*. Ainsi, Clark et ses collaborateurs (1997) ont mis en évidence une importante diversité génétique, et ce, seulement à partir de 30 isolats. La comparaison des profils RFLP, appelés « riboprints », a permis de regrouper ces isolats en 7 ribotypes différents (Clark, 1997). Il est à noter que 2 de ces isolats comportent un riboprint identique à celui d'un isolat provenant d'un cobaye, indiquant que certaines infections par *B. hominis* pourraient avoir une origine zoonotique, hypothèse précédemment émise par Yoshikawa (Yoshikawa *et al.*, 1996).

L'analyse RFLP d'autres gènes, tels que celui codant pour le facteur d'élongation 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) peut également mettre en évidence l'hétérogénéité génétique de *Blastocystis*. Les profils RFLP générés par l'utilisation du gène *ef-1 $\alpha$*  sont désignés sous le nom de « elfaprints », les isolats comportant des profils similaires étant regroupés en elfatypes (Boorom *et al.*, 2008).





Ces études, réalisées par des techniques d'analyses moléculaires différentes, aboutissent toutes à la même conclusion : le genre *Blastocystis* présente une vaste et importante diversité génétique entre isolats. L'engouement et l'excitation de la découverte de cette hétérogénéité a conduit à une difficulté majeure. Celle-ci réside dans le fait que les différentes études menées utilisent leurs propres protocoles et classifications, sans tendre vers une harmonisation des procédés mis en œuvre, qui permettrait d'établir des comparaisons fiables entre les diverses analyses. L'établissement et la classification des différents isolats entre eux se révèlent par conséquent très compliqués. Certains chercheurs comme Hoevers suggèrent ainsi que l'optimisation des analyses doit faire intervenir un système de référencement des isolats, et de standardisation des protocoles utilisés (Hoevers *et al.*, 2000). Cette volonté grandissante se heurte néanmoins à l'absence de corrélation entre les isolats et des critères comme la spécificité d'hôte(s), ou la provenance géographique (Hoevers *et al.*, 2000).

### A.3.2 Spéciation et classification

Comme nous l'avons dit précédemment, *Blastocystis* est retrouvé non seulement chez l'homme, mais aussi chez de nombreux animaux tels que les primates, les oiseaux, les porcs, les insectes ou les reptiles, chez lesquels il présente une morphologie générale similaire. La question que se posent bon nombre de chercheurs est la suivante : les isolats provenant d'hôtes différents (homme, oiseaux, insectes... etc) appartiennent-ils à des espèces différentes de *Blastocystis* ? La solution pour certains chercheurs est d'utiliser des critères plus discriminants que l'observation, comme le profil caryotypique, ou la température optimale de croissance dans le cas des isolats retrouvés chez les reptiles. Certains scientifiques, en comparant les profils PFGE, affirment ainsi que les isolats humains et animaux sont en fait des espèces dissemblables, donnant naissance à de nouvelles espèces comme *B. ratti* (Tan *et al.*, 1997), *B. cycluri*, *B. geocheloni*, ou *B. pythoni* (Tan *et al.*, 2002), respectivement isolés d'un rat, d'un iguane, d'une tortue, et d'un serpent. Il faut cependant rester prudent, compte tenu de la variation caryotypique importante chez *B.*



*hominis* (Lanuza *et al.*, 1996). L'existence de telles différences caryotypiques entre isolats d'une même espèce a en effet également été rencontrée pour d'autres protozoaires, comme *Trypanosoma brucei* ou *Giardia duodenalis* (El-Sayed *et al.*, 2000; Isaac-Renton *et al.*, 1993; Melville, 1997). Le nombre grandissant d'articles traitant de la diversité génétique d'isolats de *Blastocystis* permet non seulement de mettre à jour de nouveaux isolats, mais aussi d'étoffer les bases de données génomiques, généralement en séquences du gène ssu rRNA. Cette disponibilité de séquences a fait l'objet de nombreuses analyses de phylogénie moléculaire, dans le but d'étudier les affiliations phylogénétiques pouvant exister entre les divers isolats (Abe, 2004a; Arisue *et al.*, 2003; Boorom *et al.*, 2008; Noel *et al.*, 2003; Noel *et al.*, 2005; Ozyurt *et al.*, 2008; Rivera, 2008; Scicluna *et al.*, 2006; Souppart *et al.*, 2009; Souppart *et al.*, 2010; Whipps *et al.*, 2010; Yoshikawa *et al.*, 2009).

Des analyses phylogénétiques de la séquence du gène ssu rRNA de 10 isolats provenant de 6 hôtes différents (homme, porc, canard, dinde, rat et poulet) ont permis de montrer que ces isolats pouvaient être classés en 3 groupes distincts, le groupe I incluant 2 isolats humains et un isolat porcin (Noel *et al.*, 2003). Ceci suggère que ces isolats appartiennent en fait à la même espèce, renforçant le caractère zoonotique de *Blastocystis*.

Arisue et collaborateurs font également la même observation à partir de 16 isolats d'origine humaine et animale. L'analyse des séquences du gène ssu rRNA montre ainsi que ces isolats peuvent être classés en 7 groupes phylogénétiquement distincts, dont 5 regroupent à la fois des isolats humains et animaux. Les auteurs suggèrent que les 7 groupes pourraient correspondre à des espèces différentes, mais que les divergences de séquences pourraient aussi s'expliquer par une vitesse d'évolution du gène ssu rRNA accrue chez le genre *Blastocystis* (Arisue *et al.*, 2003). Le message principal reste toutefois que *Blastocystis* n'a qu'une faible spécificité d'hôtes, et peut par conséquent infecter aussi bien les animaux que l'homme. L'idée sous-jacente est que les animaux susceptibles d'être en contact rapproché avec l'homme, comme les porcs, les poulets ou les rongeurs, pourraient constituer un réservoir important de contaminations.



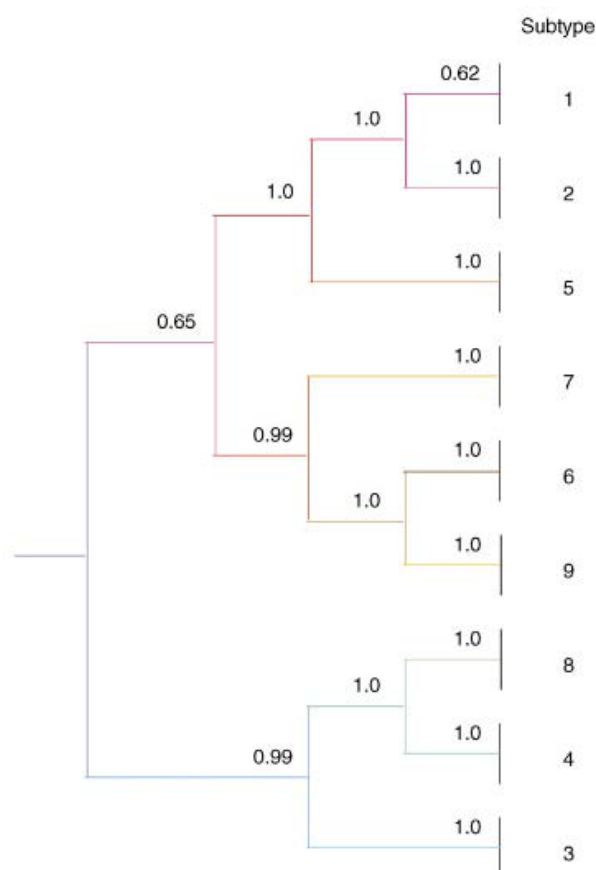
L'apport de la phylogénie moléculaire a donc permis de prouver ce caractère zoonotique et hôte-non-spécifique de l'infection par *Blastocystis*. En effet, chacune des études s'intéressant aux affinités phylogénétiques d'isolats connus (ou inconnus), donnait naissance à une classification qui lui était propre, sous forme de groupes, de sous-types, de clusters ou de ribodèmes, rendant très complexe la notion d'espèce ou de groupe d'espèces chez *Blastocystis*. La volonté d'unifier ces différentes classifications est néanmoins perceptible dans certains articles. Nous pouvons ainsi citer la publication de Noel et collaborateurs (Noel *et al.*, 2005), dans laquelle apparaît une correspondance entre l'établissement de la nouvelle classification, et la classification déjà existante d'Arisue (Arisue *et al.*, 2003) (Figure 3). Jusqu'ici, il était de coutume de parler de *Blastocystis hominis* pour des isolats provenant de selles humaines, et de *Blastocystis* sp. pour ceux d'origine animale, bien que, vous l'aurez compris, la notion d'espèce chez le genre *Blastocystis* soit relativement confuse.

Quelques années plus tard, dans le cadre d'un projet collaboratif international, un consensus sur la terminologie de *Blastocystis* fut créé (Stensvold *et al.*, 2007b). Dans cette nouvelle classification, que nous qualifierons d'universelle, tous les isolats provenant d'humains, de mammifères ou d'oiseaux sont désignés sous le nom de *Blastocystis* sp., et assignés à un des 9 sous-types (ST1-ST9) présents chez l'homme (Tableau 2), chacun des sous-types comportant une diversité génétique suffisamment divergente par rapport aux autres pour être assimilés à des espèces distinctes (Figure 4). Par la suite, un nouveau sous-type fut identifié chez des primates et des artiodactyles, et désigné sous le nom de *Blastocystis* sp. ST10 (Stensvold *et al.*, 2009a). Plus récemment, 3 sous-types supplémentaires (ST11, ST12 et ST13) ont été identifiés chez des animaux de zoo (Parkar *et al.*, 2010).

Les approches moléculaires modernes ont donc non seulement permis de mettre en évidence l'énorme hétérogénéité génétique de *Blastocystis*, mais surtout de conceptualiser celle-ci, à travers une classification universelle. Les études phylogénétiques menées sur les séquences du gène ssu rRNA de nombreux isolats indiquent que ce parasite n'est pas

Clade <sup>a</sup>	Subtype <sup>b</sup>	Group and subtype <sup>c</sup>	Subtype <sup>d</sup>	Ribodème <sup>e,f</sup>	Subgroup <sup>g</sup>	Cluster <sup>h</sup>	Subtype <sup>i</sup>	Consensus
I	I	I/1	1	1, 8	III	E	1, 1 variant	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 1
II	II	II/5	5	6	V	C, D	–	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 2
–	X	I+II/1+5	–	–	–	–	–	Chimaeric sequence
III	III	III/3	3	2, 7, 4, 5	I, II	A	3	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 3
IV	IV	IV/7	7	3	IV	B	–	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 4
–	IVa	IV/7	–	–	–	–	–	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 8
V	V	V/6	6	–	–	–	–	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 5
VI	VI	VI/4	4	9	–	–	4	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 6
–	VIa	VI/4	–	–	–	–	–	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 9
VII	VII	VII/2	2	10	VI	–	2	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 7
–	VII	VII/2	–	–	–	–	–	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 7

**Tableau 2. Corrélation entre les différentes classifications existantes des sous-types de *Blastocystis* sp. et consensus proposé par Stensvold *et al.* (2007).** <sup>a</sup> Clades décrits par Arisue *et al.* (2003) et Yoshikawa *et al.* (2004). <sup>b</sup> Sous-types décrits par Scicluna *et al.* (2006). <sup>c</sup> Groupes et sous-types décrits par Noel *et al.* (2005). <sup>d</sup> Sous-types décrits par Yoshikawa *et al.* (1998, 2000). <sup>e,f</sup> Ribodèmes décrits par Clark (1997), et Yoshikawa *et al.* (2000). <sup>g</sup> Sous-groupes décrits par Böhm-Glönig *et al.* (1997). <sup>h</sup> Clusters décrits par Stensvold *et al.* (2006). <sup>i</sup> Sous-types décrits par Yoshikawa *et al.* (2000). D'après Stensvold *et al.*, 2007.



**Figure 4. Relations phylogénétiques des 9 sous-types proposés par Stensvold *et al.* (2007).** Les nombres correspondent aux probabilités bayésiennes postérieures. *Proteromonas lacertae* est utilisé comme groupe externe (non montré). D'après Stensvold *et al.*, 2007.

spécifique d'un hôte en particulier, mais que certains animaux, comme les porcs ou les poulets, pourraient constituer un réservoir de contaminations d'origine zoonotique. L'éventuelle pathogénie de *Blastocystis* pourrait être liée au génotype, conduisant ainsi à l'existence de sous-types pathogènes et non pathogènes. Cette hypothèse, émise par certains auteurs (Arisue *et al.*, 2003; Clark, 1997), doit bien entendu être vérifiée.

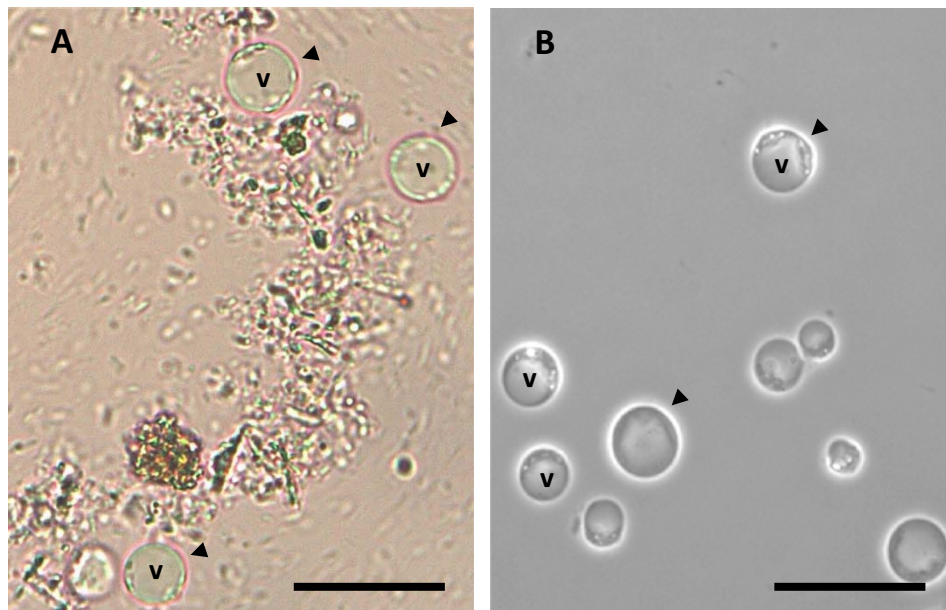
## **B. La biologie de *Blastocystis* sp.**

### **B.1 Un organisme polymorphe**

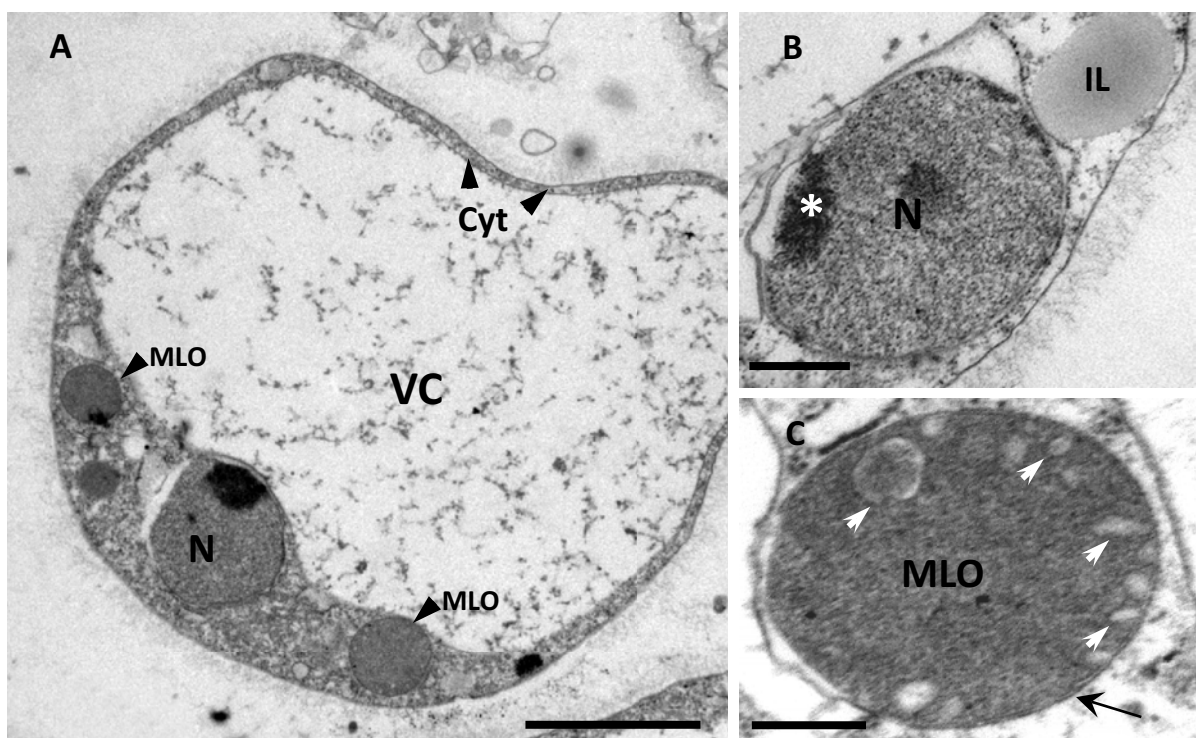
Ce protozoaire parasite anaérobie présente un polymorphisme important, se traduisant par l'existence de quatre formes majeures, connues sous le nom de forme vacuolaire, granulaire, amiboïde et kystique, rencontrées dans les selles de patients infectés et en culture *in vitro* (Tan *et al.*, 2002). D'autres formes, observées de façon occasionnelle, ont également été mises en évidence notamment dans des échantillons de selles et de coloscopies (Stenzel and Boreham, 1996). Certaines présentent une absence de vacuole centrale (caractérisant la forme vacuolaire) et sont qualifiées de formes avacuolaires, alors que d'autres comportent une multitude de vacuoles, définissant ainsi la forme multivacuolaire (Stenzel *et al.*, 1991).

La plupart des données rapportées sur le caractère polymorphe de *Blastocystis* sont liées à des études microscopiques descriptives de la morphologie individuelle de chacune des formes, mais n'apportent que peu d'informations sur le « passage » d'une forme à une autre au cours du cycle de vie du parasite (qui est de surcroît hypothétique), et sur l'explication biologique de l'existence de ces différentes formes. Néanmoins, certains auteurs ont montré que le passage réciproque entre la forme kystique et la forme vacuolaire était possible *in vitro* (Chen *et al.*, 1999; Moe *et al.*, 1999; Zaman *et al.*, 1999a), apportant ainsi des informations sur le mode de développement de *Blastocystis* sp.





**Figure 5. Observations en microscopie photonique de formes vacuolaires.** (A) Observations à partir d'un échantillon de selles d'un patient infecté par *Blastocystis* sp. (B) Observation d'une culture axénique de *Blastocystis* sp. réalisée au laboratoire. Noter la présence de la vacuole centrale (v) caractérisant la forme vacuolaire (pointes de flèche). Echelle : 20 µm. Photos réalisées par Philippe Poirier et Michaël Roussel (UMR CNRS 6023, LMGE).



**Figure 6. Observations en microscopie électronique à transmission de la forme vacuolaire de *Blastocystis* sp. rencontrée en culture *in vitro*.** (A) La forme vacuolaire est caractérisée par une large vacuole centrale (VC), entourée par une fine bande de cytoplasme (Cyt), au sein duquel se trouvent le noyau (N), et des organites à double membrane (MLO). (B) Grossissement montrant l'ultrastructure du noyau (N) ainsi que les structures qui l'entourent, comme des inclusions lipidiques (IL). (C) Grossissement d'un MLO montrant la présence d'une double membrane (flèche), et de structures pouvant être apparentées à des crêtes (pointes de flèche). Echelle: (A) 5 µm, (B) 1 µm, (C) 300 nm. Photos réalisées par Damien Brosseau (UMR CNRS 6023, LMGE).

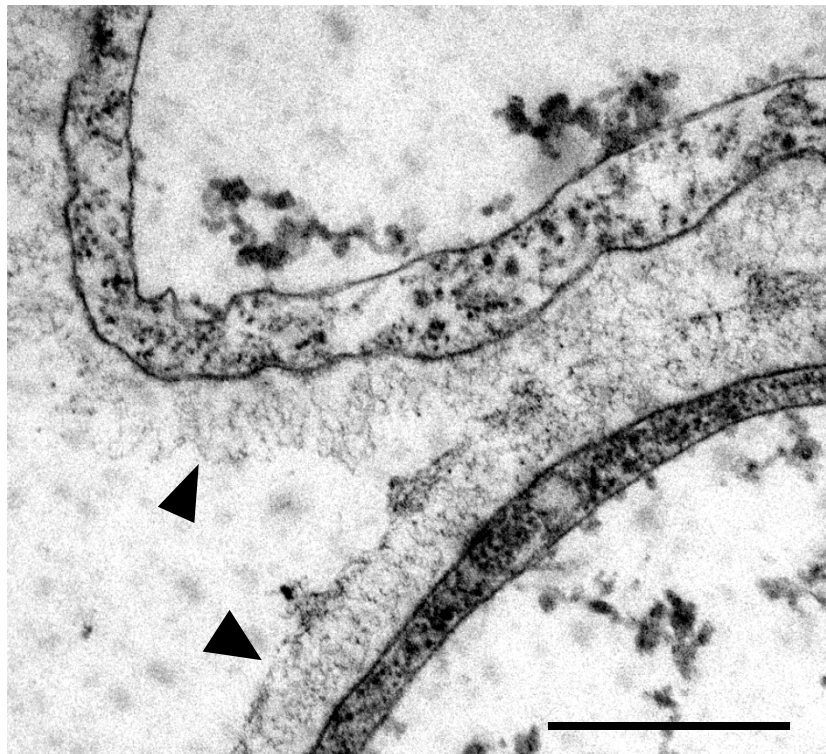
L'observation en microscopie électronique à transmission met en évidence des organites typiquement eucaryotes, les plus commodément repérables étant le(s) noyau(x), l'appareil de Golgi, et le réticulum endoplasmique. On constate également la présence d'organites à double membranes possédant des crêtes, faisant étrangement penser à des mitochondries, ce qui paraît naturellement surprenant chez un organisme anaérobie. Ces organites, possédant vraisemblablement des caractéristiques métaboliques mitochondriales et hydrogénomales (Stechmann *et al.*, 2008; Wawrzyniak *et al.*, 2008) ont été nommés « mitochondria-like organelles » (MLOs).

Le deuxième chapitre de cette introduction bibliographique sera ainsi consacré aux divers organites apparentés aux mitochondries, où nous verrons plus en détails leurs capacités métaboliques propres, montrant que l'existence de tels organites chez *Blastocystis* n'est pas un cas isolé.

### *B.1.1 La forme vacuolaire*

Considérée comme la forme typique de reconnaissance de *Blastocystis* sp., la forme vacuolaire se présente sous un aspect sphérique et demeure la forme prédominante rencontrée en culture *in vitro* et dans les échantillons de selles (Figure 5). Sa taille est en moyenne de 10 µm de diamètre, mais certaines observations indiquent qu'elle peut varier d'une manière considérable aussi bien entre différents isolats qu'au sein d'un même isolat (Yaicharoen *et al.*, 2006). Dunn et ses collaborateurs ont ainsi mis en évidence, à partir de 10 isolats humains, une variation de taille s'étalant de 4 à 63 µm (Dunn *et al.*, 1989). La forme vacuolaire peut parfois atteindre des dimensions records en culture axénique, de l'ordre de 200 µm de diamètre (Stenzel and Boreham, 1996).

Comme son nom l'indique, la forme vacuolaire est caractérisée par la présence d'une vacuole en position centrale occupant environ 90% du volume de la cellule (Figure 6), repoussant ainsi le cytoplasme sous forme d'une fine bande périphérique. Les organites cellulaires comme le(s) noyau(x), les MLOs, l'appareil de Golgi, et le réticulum

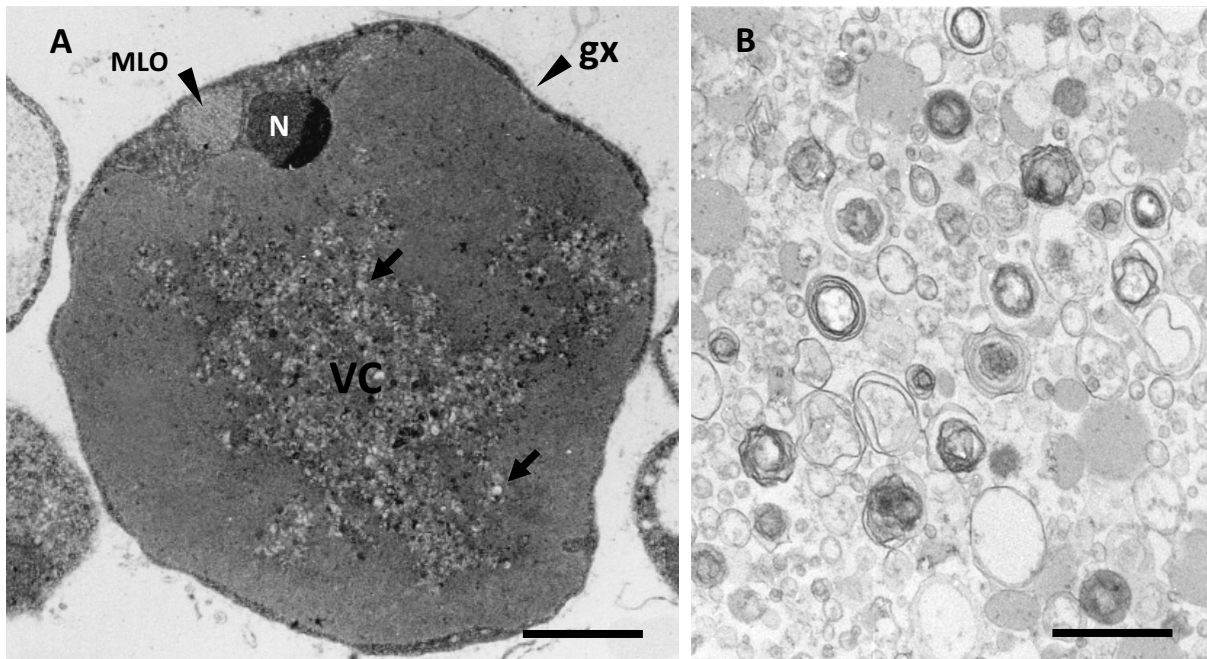


**Figure 7. Observation en microscopie électronique à transmission du manteau de surface (glycocalyx) entourant la forme vacuolaire.** Le glycocalyx (pointes de flèches) entourant la forme vacuolaire peut atteindre une épaisseur de 200 nm. Echelle : 500 nm. *Photo réalisée par Damien Brosseau (UMR CNRS 6023, LMGE).*

endoplasmique sont la plupart du temps regroupés à une extrémité de la cellule, conduisant à un épaississement de la bande cytoplasmique à cet endroit (Tan, 2008).

La vacuole centrale apparaît la plupart du temps transparente en microscopie photonique, bien que la présence de fines structures membranaires soit observable de temps à autres. La fonction exacte de cette vacuole n'est pas encore connue mais certains auteurs ont montré la présence de glucides et de lipides, proposant un rôle de stockage d'espèces carbonées nécessaires au développement de la cellule (Yoshikawa *et al.*, 1995a; Yoshikawa *et al.*, 1995b). Certains auteurs suggèrent également que *Blastocystis* sp. serait capable de se multiplier par un mode de reproduction assimilé à de la schizogonie. Leurs observations montrent au sein de la vacuole centrale, des structures ressemblant à des formes vacuolaires de petites tailles. Selon eux, la vacuole jouerait donc un rôle essentiel dans ce mode de reproduction (Singh *et al.*, 1995; Suresh *et al.*, 1994b). Cette hypothèse est néanmoins très controversée et peu probable, compte tenu de l'extrême ressemblance de cette « progéniture » avec la description des granules métaboliques présents dans la vacuole centrale de la forme granulaire (Tan and Stenzel, 2003; Windsor *et al.*, 2003). La présence d'ADN au niveau de ces structures n'a également jamais été prouvée. Enfin, cette vacuole pourrait avoir un rôle dans la mort cellulaire programmée du parasite, l'invagination de matériel cytoplasmique à l'intérieur de la vacuole, pouvant correspondre à des corps apoptotiques, étant parfois observée (Nasirudeen *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2001; Tan and Nasirudeen, 2005).

La forme vacuolaire est très souvent entourée d'un manteau de surface, pouvant être apparenté à un glycocalyx (Lanuza *et al.*, 1996), dont l'épaisseur varie en fonction des conditions de culture (Figure 7). Celui-ci est relativement épais pour des parasites fraîchement isolés de fèces, mais devient de plus en plus fin durant les étapes de culture en laboratoire (Cassidy *et al.*, 1994). Certaines cellules en sont même complètement dépourvues *in vitro* (Dunn *et al.*, 1989). La raison pouvant expliquer cette variation d'épaisseur est encore inconnue. Un rôle de ce glycocalyx serait de piéger des bactéries, en vue d'un apport de nutriments pour la croissance de la cellule (Zaman *et al.*, 1997b; Zaman



**Figure 8. Observations en MET de la forme granulaire de *Blastocystis* sp.**

(A) La forme granulaire est également entourée d'un glycocalyx (gx) et présente une large vacuole (VC) au contenu très granuleux (flèches). Autour de la vacuole est observée une fine bande de cytoplasme dans lequel on retrouve, de manière similaire à la forme vacuolaire, les organites comme le noyau (N) et des organites à double membrane (MLO). (B) Grossissement des granules présents dans la vacuole centrale. Echelle : 2  $\mu$ m (A), 100 nm (B). D'après Stenzel et Boreham, 1996.

*et al.*, 1999a). Ce manteau de surface pourrait également protéger le parasite contre le choc osmotique (Cassidy *et al.*, 1994), et constituer une barrière mécanique contre les effecteurs du système immunitaire de l'hôte (Tan *et al.*, 1997).

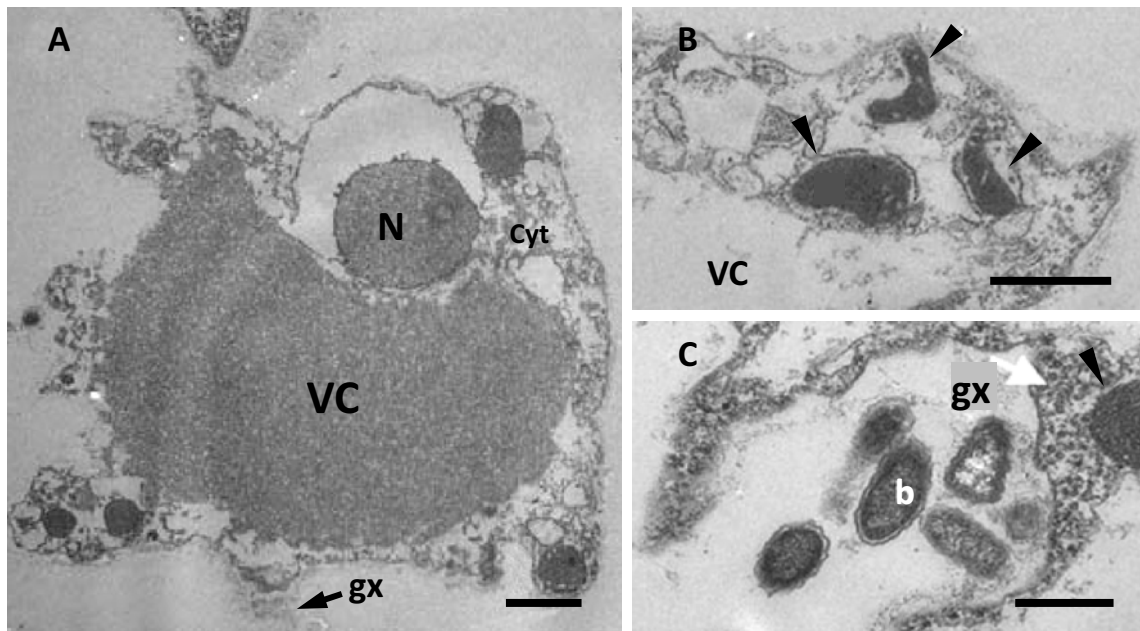
### **B.1.2 La forme granulaire**

La forme granulaire de *Blastocystis* sp. est morphologiquement identique à la forme vacuolaire, mais est caractérisée par la présence de granules très hétérogènes au sein de la vacuole centrale (Figure 8). Ces structures ont la forme de granules, de vésicules, de tailles plus ou moins importantes, et possèdent parfois une morphologie proche de celle des inclusions de myéline (Dunn *et al.*, 1989). La forme granulaire est principalement rencontrée dans des cultures relativement vieilles, ou soumises à l'action d'antibiotiques. Celle-ci serait plutôt une forme vacuolaire au contenu cellulaire particulier, plutôt qu'un stade parasitaire distinct (Boreham and Stenzel, 1993b; Stenzel and Boreham, 1996).

### **B.1.3 La forme amiboïde**

La forme amiboïde est rarement observée, et les descriptions morphologiques réalisées sont souvent contradictoires. La forme amiboïde apparaît comme une structure relativement petite (de 2,6 à 7,8  $\mu\text{m}$ ) aux contours irréguliers formant de larges pseudopodes. Les études ultrastructurales en microscopie électronique à transmission (MET) ont mis en évidence la présence de bactéries dans des vacuoles pouvant correspondre à des lysosomes, suggérant un rôle nutritif de cette forme. Curieusement, les organites types de la forme vacuolaire, tels que la vacuole centrale, les MLOs, ou le manteau de surface semblent être absents (Dunn *et al.*, 1989).

De manière intéressante, il a été montré que la forme vacuolaire de *Blastocystis* sp. était capable de se multiplier sur un milieu solide à base d'agar, en formant des colonies. Ce mode de culture semble favoriser la formation de nombreuses formes amiboïdes, facilitant ainsi leur étude (Tan *et al.*, 1996b; Tan *et al.*, 2000). Ces cellules d'environ 10  $\mu\text{m}$ , présentent



**Figure 9. Observations en microscopie électronique à transmission de la forme amiboïde de *Blastocystis* sp.**

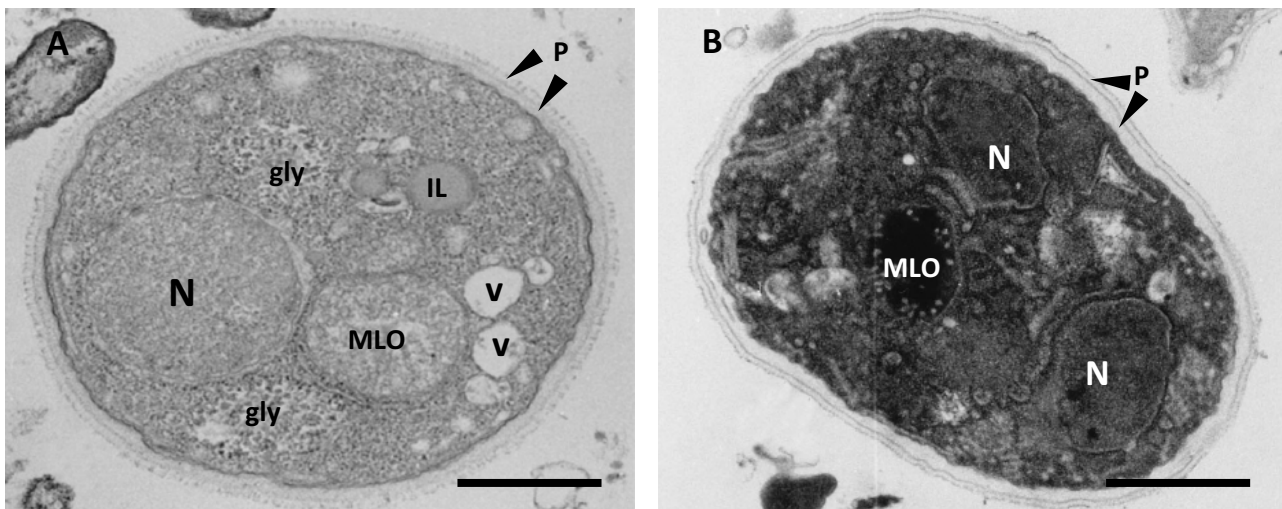
(A) La forme amiboïde, aux contours très irréguliers, est entourée d'un glycocalyx (gx), et présente une large vacuole centrale (VC). (B) Les MLO (pointes de flèche) sont souvent localisés au niveau des extensions cytoplasmiques. (C) Bactéries (b) entourées par un pseudopode. Certaines bactéries sont complètement incluses dans le glycocalyx (gx). Noter la présence d'une zone dense aux électrons (flèche), et d'un MLO (pointe de flèche). Abréviations : Cyt, cytoplasme ; N, noyau. Echelle : 1  $\mu$ m. D'après Tan et Suresh, 2006.

un contour irrégulier, de nombreux pseudopodes, et des structures ressemblant à des lysosomes, mais contrairement aux observations de Dunn, Tan et ses collaborateurs révèlent la présence d'une vacuole centrale (Figure 9A), et de MLOs au niveau des extensions cytoplasmiques (Figure 9B, 9C), suggérant que la forme amiboïde serait impliquée dans un processus nécessitant une importante quantité d'énergie (Moe *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 2001; Tan and Suresh, 2006a).

Les auteurs restent néanmoins prudents quant à l'observation de ces formes amiboïdes *in vitro*, celles-ci pouvant correspondre aux formes rencontrées *in vivo*, ou n'être que des artéfacts de culture. Toutefois, il est important de souligner que les formes amiboïdes de *Trichomonas vaginalis* induites également par culture sur milieu solide, sont le reflet exact des formes qui adhèrent à l'épithélium vaginal *in vivo* (Scott *et al.*, 1995). La forme amiboïde de *Blastocystis* sp., de par la présence d'extensions cytoplasmiques, a fait l'objet d'une hypothèse selon laquelle elle jouerait un rôle dans la pathogénie du parasite, en adhérant aux cellules de l'épithélium intestinal de l'hôte (Katsarou-Katsari *et al.*, 2008; Tan and Suresh, 2006a, 2006b). Cette hypothèse est néanmoins remise en cause par une étude récente, qui fait état d'une absence de corrélation entre la présence de formes amiboïdes dans les selles et la symptomatologie des patients (Souppart *et al.*, 2009).

Très peu d'informations sont actuellement disponibles sur les facteurs influençant la différenciation de la forme amiboïde, ou son rôle dans le cycle de vie du parasite. Certains chercheurs suggèrent que celle-ci constituerait une forme intermédiaire entre la forme vacuolaire et la forme kystique. La présence de bactéries et de débris cellulaires à l'intérieur de structures assimilables à des lysosomes (Stenzel and Boreham, 1996; Tan *et al.*, 2001), pourrait en effet suggérer que la forme amiboïde serait impliquée dans un phénomène de stockage de nutriments, nécessaires au processus d'enkystement du parasite (Singh *et al.*, 1995; Suresh *et al.*, 1994a). Cette hypothèse n'a jamais été démontrée, mais la formation de formes amiboïdes sur milieu solide évoque néanmoins la capacité de la forme vacuolaire à se déformer pour donner une forme amiboïde *in vitro*.





**Figure 10. Observations en microscopie électronique à transmission de la forme kystique de *Blastocystis* sp.**

La forme kystique est entourée d'une paroi formée de plusieurs couches (P), et présente un (A) ou plusieurs noyaux (N) (B), des MLO, des réserves de glycogène (gly), de multiples vésicules (v) ainsi que des inclusions lipidiques (IL). Notez l'absence de la vacuole centrale retrouvée chez les autres formes du parasite. Echelle : 1 µm. D'après Stenzel et Boreham, 1996.

#### B.1.4 La forme kystique

La description de la forme kystique de *Blastocystis* sp., contrairement aux formes vacuolaires et granulaires, est relativement récente (Moe *et al.*, 1996; Moe *et al.*, 1997; Moe *et al.*, 1999; Zaman *et al.*, 1997a; Zaman, 1998; Zaman *et al.*, 1998; Zaman *et al.*, 1999b). La difficulté majeure de l'observation de kystes de *Blastocystis* sp. dans les fèces est essentiellement due à leur taille plus petite (3 à 5 µm) et leur forme, qui les rendent quasi indétectables par un examen en microscopie photonique classique. Ces kystes peuvent en effet être confondus avec des débris fécaux. La forme kystique est de plus très rarement rencontrée en culture *in vitro*. Le contenu cellulaire peut comporter un ou plusieurs noyaux (pouvant aller jusqu'à 4), des MLOs, des grains de glycogène et de lipides, ainsi que de multiples vacuoles (Figure 10) (Stenzel and Boreham, 1996; Zaman *et al.*, 1995). Les kystes ont le plus souvent une forme sphérique, et comportent une paroi plus ou moins épaisse formée de plusieurs couches (Figure 10). Certains sont entourés d'une manteau fibrillaire plus ou moins lâche, de fonction inconnue (Zaman *et al.*, 1997a).

Bien que sensible aux désinfectants usuels, le kyste est capable de survivre dans l'eau distillée pendant plus de 19 jours à température ambiante (Moe *et al.*, 1996), contrairement aux formes vacuolaires et granulaires, qui sont sensibles à l'oxygène et aux variations de température et d'osmolarité (Zierdt, 1991). Des études d'infections expérimentales de rats (Hussein *et al.*, 2008; Iguchi *et al.*, 2007; Yoshikawa *et al.*, 2004c), de souris (Moe *et al.*, 1997) et d'oiseaux (Iguchi *et al.*, 2007; Tanizaki *et al.*, 2005) par des kystes de *Blastocystis* sp., montrent également que la forme kystique serait la principale forme infectieuse du parasite, et que la transmission est de type oro-fécale (Yoshikawa *et al.*, 2004c). La forme kystique constitue donc probablement la forme de résistance et de dissémination de *Blastocystis* sp. dans l'environnement.

La volonté de comprendre le mécanisme d'enkystement a fait l'objet d'études très intéressantes. Des protocoles permettant d'induire la formation de kystes *in vitro* ont ainsi été mis au point, à partir de la mise en culture de formes vacuolaires dans un milieu



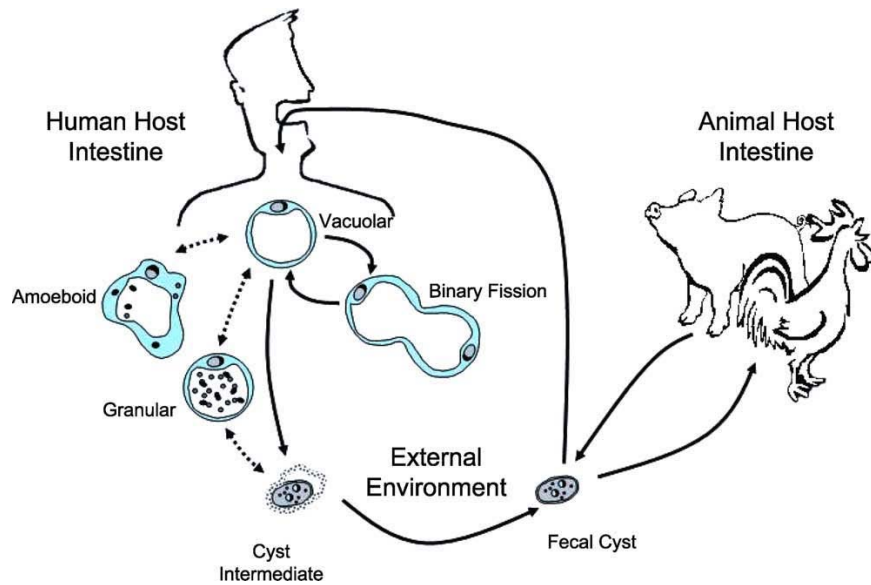
spécifique dit « d'enkystement » (Suresh *et al.*, 1993; Villar *et al.*, 1998). La forme vacuolaire est donc capable, dans des conditions particulières d'incubation, de donner naissance à un kyste. Il est également à noter que la forme amiboïde serait un intermédiaire entre la forme vacuolaire et la forme kystique, jouant un rôle nutritif dans la mise en place du processus d'enkystement (Suresh *et al.*, 1994a). Curieusement, les kystes obtenus *in vitro* ont une apparence similaire à la forme granulaire, et distincte des kystes observés dans les selles. Néanmoins, il est important de souligner que ces kystes comportent une épaisse paroi à leur périphérie, de la même manière que les kystes fécaux. Ils sont également résistants aux chocs hypotoniques (Villar *et al.*, 1998), et sont capables d'infecter des rats par inoculation par voie orale, témoignant de leur caractère de résistance vis-à-vis des sucs gastriques (Suresh *et al.*, 1993; Suresh *et al.*, 1994a).

La forme kystique, influencée par des facteurs actuellement inconnus, est à son tour capable de se différencier en formes vacuolaires, phénomène relativement bien décrit dans la littérature, par des observations en MET. Ces études, réalisées à partir de kystes fécaux mis en culture, montrent que ces derniers subissent plusieurs modifications structurales, comme l'augmentation de leur taille, la destruction de la paroi qui les entoure, ou la formation d'une vacuole centrale au sein de leur cytoplasme. Au terme de ce processus de dékystement, le kyste donnera ainsi naissance à plusieurs formes vacuolaires (environ 4), certaines ayant l'apparence de formes granulaires (Chen *et al.*, 1999; Moe *et al.*, 1999; Zaman *et al.*, 1999b).

## **B.2 Cycle de vie et mode de contamination**

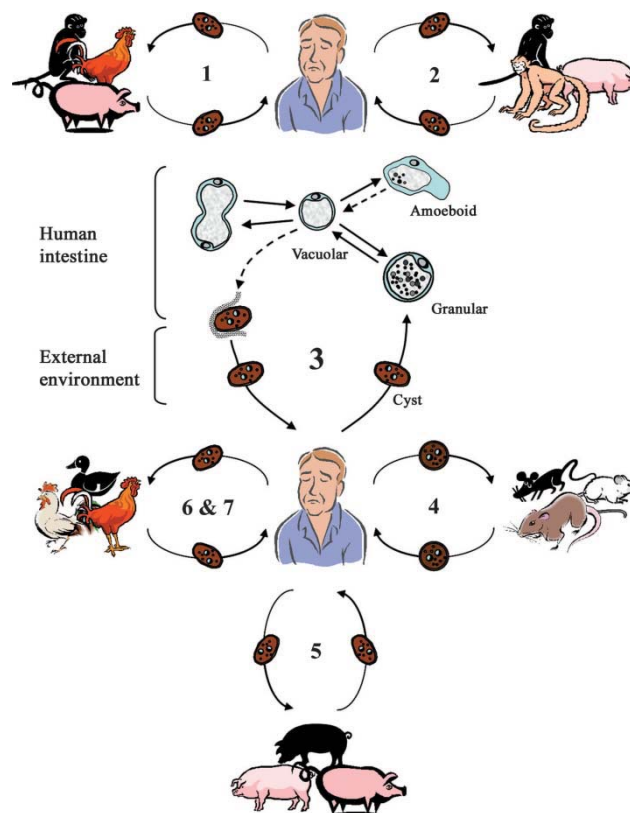
### *B.2.1 Un cycle de vie encore hypothétique*

De nombreux cycles de développement, parfois contradictoires, ont été proposés pour *Blastocystis* sp. (Boreham and Stenzel, 1993b; Singh *et al.*, 1995; Stenzel and Boreham, 1996; Tan, 2004, , 2008). Les raisons principales de ces discordances proviennent essentiellement de la nature pléiomorphe de ce parasite, de l'absence de modèles animaux



**Figure 11. Cycle de développement de *Blastocystis* sp. proposé par Tan, 2004.**

L'infection est initiée lorsque le kyste de *Blastocystis* sp. est ingéré par un hôte (humain ou animal). Le kyste se développe alors en formes vacuolaires dans l'intestin, qui vont se multiplier par fission binaire. Certaines formes vacuolaires vont ensuite redonner des kystes qui seront disséminés dans l'environnement par l'intermédiaire des fèces, et pourront contaminer un nouvel hôte (ou le même) par une transmission de type oro-fécale. Le développement des autres formes étant peu connu, celles-ci sont représentées par des flèches en pointillés.



**Figure 12. Cycle de développement de *Blastocystis* sp. revisité par Tan, 2008.**

Ce cycle de développement fait intervenir l'existence de sous-types zoonotiques, suggérant que l'homme peut être potentiellement infecté par au moins 7 sous-types, et que certains animaux peuvent représenter d'importants réservoirs de contamination. Le sous-type 3 (ST3) semble être le seul uniquement retrouvé chez l'homme.

propices à la vérification du postulat de Koch, mais également de la conviction que *Blastocystis* sp. utilise plusieurs modes de reproduction (Govind *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2007). Ainsi, il a été proposé que cet organisme pourrait se diviser par schizogonie (Singh *et al.*, 1995), plasmotomie (Tan and Suresh, 2007), ou endodyogénie (Zhang *et al.*, 2007). Pour certains chercheurs, l'observation de ces modes de reproduction n'est qu'artéfactuelle, et n'est due qu'au caractère pléiomorphe de cet organisme (Tan, 2008). A l'heure actuelle, en l'absence de preuve prouvant de manière certaine l'existence *in vivo* de ces modes de division, seule la fission binaire, qui est régulièrement observée dans les selles, est acceptée.

Les études menées sur l'observation et les mécanismes de différenciation de certaines formes morphologiques de *Blastocystis* sp. ont fourni d'importantes données sur la compréhension du cycle de développement de ce parasite. Ainsi, le cycle de vie proposé par Tan (2004), postule que l'infection est initiée lorsque le kyste de *Blastocystis* sp. est ingéré par un hôte, humain ou animal. Le kyste ainsi ingéré se développe alors en formes vacuolaires, au niveau de l'intestin, qui vont ensuite se diviser par fission binaire. Certaines formes vacuolaires vont s'enkyster, conduisant à l'apparition de kystes dans les selles, qui pourront à leur tour contaminer un nouvel hôte, voir le même hôte (Figure 11) (Tan, 2004). Le rôle exact des formes amiboïdes et granulaires n'est pas clairement élucidé, celles-ci n'apparaissent pas de manière active dans le cycle de développement proposé. Plus récemment, Tan (2008) décide de réaliser une mise à jour de ce cycle, en incluant les données liées aux sous-typages de *Blastocystis* sp., et à leur éventuelle spécificité d'hôte(s) (Figure 12). Ce nouveau cycle prend de surcroît en considération l'aspect zoonotique de la plupart des sous-types rencontrés chez l'homme, certaines groupes d'animaux pouvant constituer un important réservoir de contamination (Tan, 2008).



### B.2.2 L'eau comme source de contamination

Les informations apportées au mode de contamination par *Blastocystis* sp., qui serait de type oro-fécale (Yoshikawa *et al.*, 2004c), couplées au caractère résistant de la forme kystique dans l'eau (Moe *et al.*, 1996), ont conduit certaines équipes de recherche à prendre en considération l'hypothèse selon laquelle la prévalence observée pour certaines populations ou certains pays, pourrait être liée à la consommation d'eau contaminée, ou à la proximité avec des animaux tels que le porc (Banaticla and Rivera, 2011; Eroglu and Koltas, 2010; Leelayoova *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007b; Navarrete and Torres, 1994; O'Gorman *et al.*, 1993; Taamasri *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 1992; Zaman *et al.*, 1994).

Dans une analyse réalisée à partir d'une population composée de soldats de l'armée thaïlandaise et de leur famille, Taamasri et collaborateurs (2000) constatent que *Blastocystis* sp. est le parasite le plus fréquemment rencontré dans les selles de ces personnes, avec une prévalence supérieure à 20% (Taamasri *et al.*, 2000). De manière significative, les auteurs relient cette forte prévalence avec la consommation d'eau non filtrée ou non stérilisée, potentiellement contaminée par des kystes de *Blastocystis* sp.

Le manque d'hygiène, de structures sanitaires, et l'absence complète de systèmes de purification de l'eau de boisson sont également des facteurs favorisant la contamination par *Blastocystis* sp. Malheureusement, certains pays en développement n'ont pas les moyens pour satisfaire ces exigences en matière d'hygiène, expliquant la forte prévalence de ce parasite. Ainsi, dans le cadre d'une analyse coprologique réalisée sur une population d'enfants au Chili (sur la côte de la province de Valdivia), *Blastocystis* sp. est le protozoaire intestinal le plus représenté (29,4%). Cette forte prévalence est intimement liée au caractère oro-fécal de la contamination. En effet, l'environnement dans lequel vivent ces enfants est totalement dépourvu de structures sanitaires, et comporte un péril fécal important du fait de la contamination fécale de la rivière Valdivia (Navarrete and Torres, 1994).





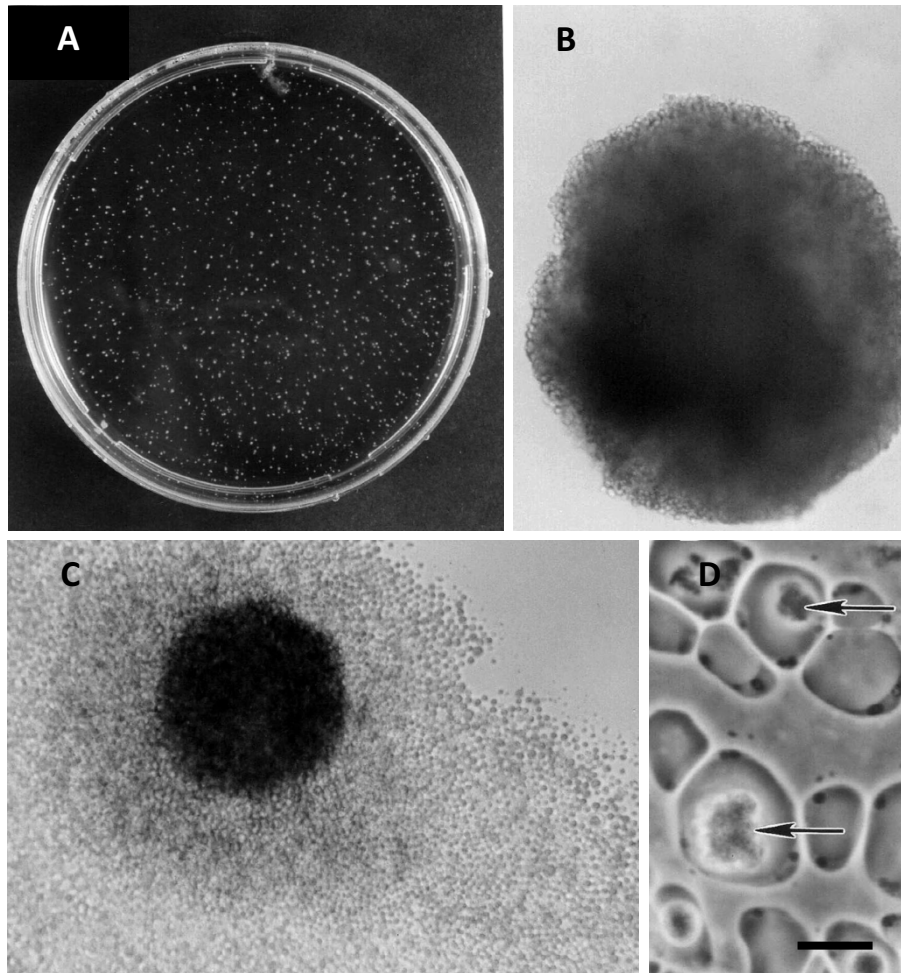
Il est important de noter qu'en 2006, *Blastocystis* sp. a été ajouté par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans les protocoles de recherche de parasites pour la vérification de la qualité de l'eau de boisson ([http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/gdwqrevision/blastocystis/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/gdwqrevision/blastocystis/en/)), montrant l'intérêt croissant de ce parasite vis-à-vis des problèmes de santé publique qui pourraient apparaître.

### **B.3 Culture en laboratoire**

De nombreux sous-types de *Blastocystis* sp. sont actuellement maintenus en culture *in vitro*. Bien que plusieurs milieux de culture puissent être utilisés pour la croissance de ce parasite, l'incubation a lieu dans des jarres anaérobies, et généralement à 37°C. La température d'incubation peut néanmoins être différente selon la provenance de l'isolat. Ainsi, les isolats provenant de reptiles sont préférentiellement incubés à 25°C (Singh *et al.*, 1996).

Les cultures xéniques ou monoxéniques de *Blastocystis* sp. sont généralement maintenues dans le milieu de Jones (Jones, 1946), ou de Boeck et Drbohlav's (Boeck and Drbohlav, 1925). Le milieu de Jones est de loin le milieu le plus utilisé, notamment dans la mise en culture d'échantillons de selles provenant de patients, dans le cadre de certaines études de sous-typages (Leelayoova *et al.*, 2002; Stensvold *et al.*, 2007a; Termmathurapoj *et al.*, 2004). Il est également utilisé dans les premières phases de culture xénique du parasite, en vue d'éventuels protocoles d'axénisation. Les cultures axéniques, constituées de la forme vacuolaire du parasite, sont quant à elles maintenues en milieu IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) ou MEM (Minimal Essential Medium), additionné de 10% à 30% de sérum de cheval (Ho *et al.*, 1993). Afin de limiter la présence d'oxygène dans le milieu de culture, celui-ci est préalablement pré-réduit en chambre anaérobie pendant 48h.

Le protocole d'axénisation peut parfois être long (de quelques semaines à plusieurs mois), laborieux, et peut dans certains cas se solder par un échec. La capacité de *Blastocystis* sp. à former des colonies à partir d'un milieu à base d'agar a permis une avancée notable



**Figure 13. Colonies de *Blastocystis* sp. sur milieu IMDM solide.**

(A) Boîte de Pétri présentant de nombreuses colonies de *Blastocystis* sp. (B, C) Grossissement d'une seule colonie. (D) Formes amiboïdes isolées à partir d'une colonie. Noter la présence de larges inclusions (flèches) au sein de la vacuole. Echelle : 10  $\mu$ m. D'après Tan, 2008.

dans l'optimisation des protocoles d'axénisation. Cette capacité n'est pas propre à ce parasite, puisque celle-ci a été utilisée par le passé, pour d'autres protozoaires comme *Trichomonas vaginalis* (Hollander, 1976), *Entamoeba* (Gillin and Diamond, 1978a, 1978b), *Giardia intestinalis* (Gillin and Diamond, 1980), ou encore *Trypanosoma brucei* (Carruthers and Cross, 1992). Cette propriété fournit un outil puissant puisqu'elle permet d'obtenir des populations clonales, qui constituent un atout dans les études de génétique et de biochimie.

La faculté de *Blastocystis* sp. à former des colonies n'a été découverte que relativement récemment (Tan *et al.*, 1996b; Tan *et al.*, 2000). Elle consiste à étaler une fraction de culture provenant d'un milieu liquide à la surface d'un milieu solide contenant de l'agar, de l'IMDM et 10% de sérum de cheval. L'addition dans le milieu d'un agent réducteur comme le thioglycollate de sodium favorise également l'efficacité de croissance des colonies (Figure 13) (Tan *et al.*, 1996a). L'utilisation d'une telle méthode permet *a priori* de séparer physiquement les colonies de *Blastocystis* sp. des colonies bactériennes, permettant par conséquent la mise en culture d'une seule colonie parasitaire en milieu liquide. Le résultat de cette manipulation aboutit ainsi à une culture clonale, à une charge bactérienne diminuée, qui pourra être plus facilement détruite par l'action d'antibiotiques. Certains isolats de *Blastocystis* sp. ont ainsi pu être axénisés (Chen *et al.*, 1997; Ng and Tan, 1999).

L'axénisation de *Blastocystis* sp. peut également être réalisée à l'aide de cocktails d'antibiotiques (Chen *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1993; Lanuza *et al.*, 1997; Ng and Tan, 1999), liés ou non à la méthode d'incubation sur milieu solide, afin d'éliminer les bactéries provenant de la flore intestinale de l'hôte. Il est intéressant de noter que certains protocoles, dans le but d'axéniser un grand nombre d'isolats, font intervenir une phase de centrifugation différentielle, dans le but de séparer les parasites de la majorité de la charge bactérienne, et une phase de traitement par des antibiotiques. Ainsi, Lanuza et collaborateurs, sont parvenus à axéniser 25 isolats en 3 semaines, en utilisant une séparation sur gradient de Ficoll-acide métrizoïque, suivie d'un traitement antibiotique à base d'ampicilline, de streptomycine, et d'amphotéricine B (Lanuza *et al.*, 1997).



Quelques études font néanmoins état de l'échec du processus d'axénisation, et de la baisse d'efficacité de croissance de certaines cultures axénisées, émettant l'hypothèse que certains isolats de *Blastocystis* sp. auraient besoin de bactéries pour survivre (Chen *et al.*, 1997; Lanuza *et al.*, 1997).

## **B.4 Identification, Epidémiologie et Prévalence**

### ***B.4.1 L'avènement du diagnostic moléculaire***

La majorité des protocoles hospitaliers de diagnostic de *Blastocystis* sp. sont réalisés à partir d'un examen direct des selles des patients, par l'observation en microscopie photonique des formes vacuolaires. Le biais majeur de cette technique réside dans le fait que l'absence de forme vacuaire n'est pas une preuve de l'absence du parasite dans les fèces, ce qui conduit régulièrement à des faux-négatifs. En effet, l'observation directe par microscopie photonique ne permet pas de déceler la présence des kystes, qui sont de petite taille (3-5 µm) et peuvent facilement être confondus avec des débris fécaux. Pour limiter ces erreurs, il est également possible d'observer les selles après une mise en culture xénique de quelques jours en milieu de Jones, afin d'enrichir les fèces en parasites, et de faciliter le diagnostic (Stensvold *et al.*, 2007a; Stenzel and Boreham, 1996; Tan, 2008).

Néanmoins, la mise en culture d'un grand nombre de selles est coûteuse en temps, et l'observation directe ne permet pas de déterminer le sous-type de l'isolat de *Blastocystis* sp. Afin de s'affranchir de cette difficulté, des amorces spécifiques du gène ssRNA de chacun des sous-types connus à ce jour ont été mises au point, dans le but d'utiliser une approche PCR applicable directement à partir des selles (Abe *et al.*, 2003a, 2003b, 2003c; Santin *et al.*, 2011; Scicluna *et al.*, 2006; Stensvold *et al.*, 2006; Yoshikawa *et al.*, 2004a; Yoshikawa *et al.*, 2004b). De récentes études, comparant les performances de ces diverses méthodes de diagnostic, montrent que l'approche par PCR est aussi sensible et fiable que la mise en culture des fèces (Parkar *et al.*, 2007; Stensvold *et al.*, 2007a; Suresh and Smith, 2004). Plus récemment, Poirier et collaborateurs ont mis au point une méthode de diagnostic de



*Blastocystis* sp. à partir d'échantillons de selles par une approche très sensible de PCR quantitative, permettant de quantifier la charge parasitaire, et de mettre en évidence le sous-type du parasite par séquençage des produits amplifiés (Poirier *et al.*, 2011).

L'intérêt de ces techniques de diagnostic et de sous-typage permet non seulement de réaliser des études épidémiologiques, mais aussi d'alimenter les collections de divers laboratoires ou centres de bio-ressource telles que l'ATCC (<http://www.atcc.org>), en cultures axéniques de différents sous-types. Ceci serait néanmoins impossible, sans la mise au point de protocoles de cryoconservation permettant le stockage et le transport d'isolats de *Blastocystis* sp. (Suresh *et al.*, 1998).

#### **B.4.2 Epidémiologie et prévalence**

##### **B.4.2.1 Un parasite intestinal cosmopolite**

De nombreuses enquêtes épidémiologiques effectuées dans différents pays identifient *Blastocystis* sp. comme le parasite intestinal le plus fréquemment retrouvé dans la population humaine. En France, grâce au réseau national *Crypto*-ANOFEL (ANOFEL, 2010), comme aux Etats-Unis (Boorom *et al.*, 2008), la prévalence de ce parasite est en effet plus importante que celle d'autres protozoaires parasites intestinaux comme *Giardia*, *Entamoeba* ou *Cryptosporidium*.

La prévalence observée varie beaucoup d'un pays à un autre, voire d'une population à une autre pour un même pays (Souppart *et al.*, 2009; Tan, 2008). Cette différence peut s'expliquer, nous l'avons vu, par le manque d'hygiène, le contact avec certains animaux comme le porc, et la consommation d'eau ou de nourriture contaminée par des kystes, la voie oro-fécale étant considérée comme la voie de contamination privilégiée de *Blastocystis* sp. (Eroglu and Koltas, 2010; Leelayoova *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007b). La prévalence peut être faible dans certains états comme le Japon (0,5-1%) (Hirata *et al.*, 2007) ou Singapour (3,3%) (Wong *et al.*, 2008) et élevée pour des pays en voie de développement tels que le Brésil (40,9%) (Aguiar *et al.*, 2007), l'Egypte (33,3%) (Rayan *et al.*, 2007), ou l'Indonésie (60%)



Countries	No. of isolates	Subtype classification (% in parentheses)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Unknown
Bangladesh	26	2 (7.7)	0	24 (92.3)	0	0	0	0	0	0	0
China	202	56 (27.7)	11 (5.4)	125 (61.8)	1 (0.5)	0	1 (0.5)	0	0	0	8 (4.0)
China	40	18 (45.0)	0	19 (47.5)	0	0	0	2 (5.0)	0	0	1 (2.5)
China	80	18 (22.5)	2 (2.5)	56 (70.0)	1 (1.2)	0	0	0	0	0	3 (3.8)
Denmark	28	5 (17.9)	9 (32.1)	13 (46.4)	1 (3.6)	0	0	0	0	0	0
Denmark	29	1 (3.4)	6 (20.7)	15 (51.7)	7 (24.1)	0	0	0	0	0	0
Egypt	44	8 (18.2)	0	24 (54.5)	0	0	8 (18.2)	4 (9.1)	0	0	0
England	29	2 (6.9)	1 (3.4)	22 (75.9)	4 (13.8)	0	0	0	0	0	0
England	55	3 (5.4)	9 (16.4)	22 (40.0)	17 (31.0)	0	0	1 (1.8)	3 (5.4)	0	0
France	43	11 (25.6)	4 (9.3)	23 (53.5)	4 (9.3)	0	0	1 (2.3)	0	0	0
Germany	12	3 (25.0)	2 (16.7)	5 (41.7)	2 (16.7)	0	0	0	0	0	0
Germany	171	40 (23.4)	1 (0.6)	118 (69.0)	12 (7.0)	0	0	0	0	0	0
Greece	45	9 (20.0)	6 (13.3)	27 (60.0)	1 (2.2)	0	1 (2.2)	1 (2.2)	0	0	0
Japan	64	10 (15.6)	13 (20.3)	31 (48.4)	7 (10.9)	0	0	0	0	0	3 (4.7)
Japan	50	4 (8.0)	0	26 (52.0)	2 (4.0)	0	11 (22.0)	5 (10.0)	0	2 (4.0)	0
Pakistan	10	2 (20.0)	0	7 (70.0)	0	0	1 (10.0)	0	0	0	0
Singapore	9	2 (22.2)	0	7 (77.8)	0	0	0	0	0	0	0
Turkey	96 <sup>a</sup>	19 (19.8)	22 (22.9)	55 (57.3)	0	0	0	0	0	0	0
Turkey	87	8 (9.2)	12 (13.8)	66 (75.9)	1 (1.1)	0	0	0	0	0	0
	1,120	221 (19.7)	98 (8.7)	685 (61.2)	60 (5.4)	0	22 (2.0)	14 (1.2)	3 (0.3)	2 (0.2)	15 (1.3)

**Tableau 3. Répartition des sous-types de *Bastocystis* sp. dans la population humaine de différents pays.** Les nombres entre parenthèses correspondent aux pourcentages. Noter que le sous-type 3 (ST3) comporte la plus forte prévalence. D'après Souppart et al., 2009.

(Pegelow *et al.*, 1997). Cette prévalence peut être assez variable dans certains pays selon l'échantillon de population étudié, ou la méthode de diagnostic. Celle-ci est en effet comprise entre 1,9 et 32,6% en Chine (Li *et al.*, 2007a) et entre 0,9 et 45,2% en Thaïlande (Saksirisampant *et al.*, 2003; Saksirisampant *et al.*, 2006).

#### *B.4.2.2 Prédominance de certains sous-types dans la population humaine*

La plupart des échantillons de selles inclus dans les enquêtes épidémiologiques concernent des infections par *Blastocystis* sp. par un seul sous-type. Les données disponibles sur la prévalence d'infections d'un même hôte par plusieurs sous-types, impliquant donc l'exposition à de multiples sources de contamination, indiquent que celle-ci est relativement similaire entre les pays, et comprise entre 2,6% et 14,3% (Dogruman-Al *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007b; Souppart *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2006).

La quasi-totalité des études épidémiologiques menées sur *Blastocystis* sp. rapportent que la majorité des infections humaines sont attribuées au sous-type 3 (ST3), avec une prévalence mondiale estimée à 61,2% (Tableau 3) (Dogruman-Al *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007a; Meloni *et al.*, 2011; Souppart *et al.*, 2009; Souppart *et al.*, 2010). Quelques exceptions montrent cependant une forte prévalence du sous-type 4 (ST4) en Espagne (Dominguez-Marquez *et al.*, 2009) et au Danemark (Stensvold *et al.*, 2011), et du sous-type 1 (ST1) en Thaïlande (Thathaisong *et al.*, 2003). Néanmoins, le caractère dominant du ST3 dans la population humaine, même si celui-ci peut être retrouvé chez certains animaux, suggère fortement qu'il est le seul sous-type d'origine humaine, hypothèse déjà proposée par Noel et collaborateurs (Noel *et al.*, 2005). La prédominance de ce sous-type pourrait par conséquent être principalement expliquée par une contamination interhumaine (Yoshikawa *et al.*, 2000).

Concernant la distribution des autres sous-types, il apparaît que les sous-types 6 (ST6) et 7 (ST7) sont régulièrement rencontrés en Asie, mais rarement observés en Europe. Le sous-type 8 (ST8) a seulement été isolé au Royaume-Uni et en Italie alors que le sous-type



9 (ST9) n'a été identifié qu'au Japon. Les infections par les sous-types 5 (ST5), 11 (ST11), 12 (ST12) et 13 (ST13) sont quant à elles épisodiques chez l'homme (Parker *et al.*, 2007; Parker *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2007).

La comparaison de la séquence du gène *ssu rRNA*, et la prévalence respective des différents sous-types dans la population humaine indiquent que la majorité des sous-types supposés être d'origine animale sont en fait zoonotiques et sont capables d'infecter l'homme. Un risque plus élevé d'infection par *Blastocystis* sp. a également été montré chez les personnes ayant un contact étroit avec les animaux, tels que les gardiens de zoo, indiquant que les animaux représentent une source significative de contamination pour l'homme (Noel *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2007; Parker *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2007; Yoshikawa *et al.*, 2009).

## **B.5 Aspects cliniques de *Blastocystis* sp.**

*Blastocystis* sp. est impliqué dans de nombreux symptômes gastro-intestinaux aspécifiques comme des diarrhées, des douleurs abdominales, des nausées, et/ou des vomissements (Boorom *et al.*, 2008; Stensvold *et al.*, 2009b; Tan, 2008). Il jouerait également un rôle significatif dans des maladies inflammatoires de l'intestin comme l'IBS (Irritable Bowel Syndrome) et l'IBD (Inflammatory Bowel Disease) (Dogruman-Al *et al.*, 2009; Giacometti *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2009; Yakoob *et al.*, 2004b; Yakoob *et al.*, 2010a, 2010b), ainsi que dans des colites ulcéreuses (Tai *et al.*, 2010; Yamamoto-Furusho and Torijano-Carrera, 2010). Dans une étude récente excluant les patients comportant d'autres protozoaires intestinaux et bactéries, Dogruman-Al et ses collaborateurs rapportent que 76% des patients atteints d'IBS sont porteurs de *Blastocystis* sp. (Dogruman-Al *et al.*, 2010). De nombreux cas montrent également une association entre *Blastocystis* sp. et la présence d'urticaire (Gupta and Parsi, 2006; Hameed *et al.*, 2010; Katsarou-Katsari *et al.*, 2008).

Il est intéressant de noter que l'observation de *Blastocystis* sp. serait liée à l'apparition d'importantes diarrhées chez des patients immunodéprimés atteints de SIDA ou



de cancer (Cirioni *et al.*, 1999; Prasad *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2009; Tasova *et al.*, 2000), et chez des patients hémodialysés (Kulik *et al.*, 2008). Une autre étude, réalisée sur une population indonésienne, a montré une prévalence de 72,4% chez des patients porteurs du virus HIV (Kurniawan *et al.*, 2009), et de 96% chez des enfants immunodéprimés présentant des symptômes diarrhéiques récurrents (Idris *et al.*, 2010).

Les quelques études qui se sont intéressées à la distribution des sous-types présents chez des patients symptomatiques et asymptomatiques, dans le but de déterminer une éventuelle pathogénie « sous-types dépendante », se sont heurtées à des résultats contradictoires (Dogruman-Al *et al.*, 2008; Dogruman-Al *et al.*, 2009; Kaneda *et al.*, 2001; Souppart *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2006). Ceci est principalement dû au nombre limité de patients examinés dans chacune de ces études épidémiologiques. Ainsi, en prenant l'exemple de patients atteints d'IBS, d'IBD ou de diarrhées chroniques, certaines données rapportent que le sous-type dominant rencontré est le sous-type 3 (ST3) (Dogruman-Al *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009), alors que d'autres études mettent en évidence une forte prévalence du sous-type 1 (ST1) (Yakoob *et al.*, 2010a). De la même façon, certaines études rapportent que le sous-type 3 (ST3) semble être prédominant chez des patients présentant une urticaire chronique (Hameed *et al.*, 2010; Katsarou-Katsari *et al.*, 2008), alors que Vogelberg et collaborateurs concluent plutôt à une prépondérance du sous-type 2 (ST2) (Vogelberg *et al.*, 2010).

Les résultats *in vivo* d'endoscopies et de biopsies chez des patients atteints de blastocystose indiquent que *Blastocystis* sp. ne présente pas de caractère invasif de la muqueuse du colon, bien que des œdèmes et une inflammation de la muqueuse intestinale soient parfois observés (Chen *et al.*, 2003; Dellers *et al.*, 1992; Zuckerman *et al.*, 1994). Cette inflammation induite par le parasite conduit à une altération des jonctions serrées aboutissant à des perturbations de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal (Dagci *et al.*, 2002).



## **B.6 *Blastocystis* sp., un microorganisme pathogène ?**

### ***B.6.1 Identification de facteurs de virulence potentiels in vitro***

Afin d'analyser l'effet cytopathique de *Blastocystis* sp. et d'identifier de potentiels facteurs de virulence, des études *in vitro* ont été menées sur des cultures de cellules de mammifères. Long et ses collaborateurs montrent que des cellules de *Blastocystis* sp. de sous-type 1 (ST1) n'induisent pas d'effet cytopathique chez les cellules épithéliales coliques humaines HT-29 et T-84. Cependant, après 24h d'incubation, la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 et du granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) sont significativement augmentée, suggérant que *Blastocystis* sp. est capable de moduler la réponse immunitaire de son hôte. Des effets similaires ont été observés en utilisant le surnageant de culture du parasite (Long *et al.*, 2001).

Plus récemment, la production d'IL-8 a été décrite comme étant dépendante de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B chez des cellules T-84, et que celle-ci est induite par la production de cystéine-protéases par *Blastocystis* sp. Hormis son effet pro-inflammatoire, la surexpression du facteur de transcription NF- $\kappa$ B pourrait également améliorer la survie et la dissémination du parasite. De plus, la production d'IL-8 par la cellule hôte pourrait aboutir à un influx de cellules inflammatoires au sein de la muqueuse intestinale, causant des dommages et des perturbations gastro-intestinales (Puthia *et al.*, 2008). Les mêmes auteurs ont aussi montré que *Blastocystis* sp. est capable d'induire une apoptose des cellules épithéliales intestinales de rat IEC-6, indépendamment du contact direct avec le parasite, de diminuer la résistance trans-épithéliale, et d'augmenter la perméabilité épithéliale (Puthia *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces données suggère que les aptitudes du parasite à moduler le système immunitaire, à altérer l'intégrité de l'épithélium, et à induire l'apoptose des cellules intestinales, pourraient jouer un rôle très important durant l'infection par *Blastocystis* sp.

Quelques années plus tard, en étudiant l'effet d'antigènes solubilisés de *Blastocystis* sp. sur la viabilité cellulaire, Chandramathi et collaborateurs (2010) ont montré que des





antigènes du parasite favoriseraient la croissance de cellules cancéreuses, telles que des cellules humaines HCT116 issues de carcinome colorectal, et diminuent la réponse immune des cellules (Chandramathi *et al.*, 2010a). Comme de nombreux autres protozoaires parasites (Sajid and McKerrrow, 2002), les cystéine-protéases de *Blastocystis* sp., montrant une forte activité *in vitro* (Sio *et al.*, 2006), sont sans aucun doute impliquées dans la survie du parasite *in vivo*, et représentent des facteurs de virulence. Des variations d'activités de type cystéine-protéase entre le sous-type 4 (ST4) et le sous-type 7 (ST7) ont néanmoins été rapportées, observations qui pourraient être attribuées à l'existence de sous-types virulents et non-virulents (Mirza and Tan, 2009). Ces protéases, présentes dans les lysats parasitaires de *Blastocystis* sp. et dans le milieu en fin de culture, sont capables de dégrader les immunoglobulines de type A (IgA) sécrétoires humaines, impliquées dans la défense immunitaire au niveau des muqueuses (Puthia *et al.*, 2005).

### B.6.2 Modèles animaux et physiopathologie

Plusieurs études d'infections expérimentales par *Blastocystis* sp. impliquant différents types d'animaux ont été reportées (Tan, 2008). Dans l'une des études pionnières de développement de modèles animaux, menée par Sureh et collaborateurs, l'observation directe des fèces de jeunes rats Wistar infectés oralement par  $10^4$  kystes (obtenus *in vitro*), montre une présence de *Blastocystis* sp. après 2 jours d'infection (Suresh *et al.*, 1993). L'autopsie, réalisée au 7<sup>ème</sup> jour, révèle un grand nombre de cellules parasitaires dans le caecum, et un nombre plus restreint au niveau du gros intestin. Toutefois, des rats infectés oralement par la forme vacuolaire du parasite ne développent pas de maladie, suggérant que le caractère résistant de la forme kystique serait essentiel à la transmission du parasite.

Une autre étude a été menée en utilisant différents protocoles d'infections expérimentales de souris BALB/c immunocompétentes par des kystes provenant d'un isolat humain (Moe *et al.*, 1997). Les animaux ont été infectés avec succès, soit oralement par des kystes, soit de manière intra-caecale par une culture *in vitro* (formes vacuolaires). L'infection



est généralement limitée, même si quelques souris présentent une perte de poids et une certaine léthargie. Des formes granulaires et vacuolaires sont observées dans le caecum, mais seule la forme kystique est retrouvée au niveau du colon. Les examens histologiques du caecum et du colon révèlent d'intenses infiltrations de cellules inflammatoires, une lamina propria œdématisée, et un décollement muqueux. Les auteurs montrent également que la susceptibilité à *Blastocystis* sp. est dépendante de l'âge chez la souris BALB/c. En effet, les jeunes souris sont plus susceptibles que les souris adultes, et sont même résistantes à l'infection lorsqu'elles sont âgées de plus de 8 semaines. Yoshikawa et ses collaborateurs (2004) démontrent qu'une infection orale ou intra-caecale avec seulement 10 kystes, suffit à aboutir à une colonisation du caecum et du gros intestin par *Blastocystis* sp. chez des rats Wistar âgés de 3 semaines (Yoshikawa *et al.*, 2004c).

Plus récemment, Hussein et ses collaborateurs (2008) ont analysé le pouvoir infectieux de 4 sous-types (ST1, ST2, ST3, ST4) provenant de patients symptomatiques et asymptomatiques sur des rats Wistar de 4 semaines, oralement infectés par des cultures axéniques. De manière intéressante, les symptômes pathologiques les plus importants sont retrouvés chez les rats infectés par des isolats provenant de patients symptomatiques, alors que les rats infectés par des isolats asymptomatiques ne présentent que de légers symptômes pathologiques (Hussein *et al.*, 2008). Les isolats symptomatiques de sous-type 1 (ST1) induisent 25% de mortalité, indiquant leur caractère pathogène, alors que des variants pathogènes et non pathogènes semblent exister au sein des sous-types 3 et 4 (ST3 et ST4). Parallèlement à ces résultats, les auteurs décrivent également chez les rats infectés par des isolats symptomatiques une intense réaction inflammatoire, un décollement de la muqueuse intestinale, des œdèmes, et la présence de polypes précancéreux au niveau du caecum et de la partie proximale du colon. Il est suggéré que l'inflammation induite par *Blastocystis* sp. a la capacité d'altérer les jonctions serrées, ce qui conduit à des perturbations et à une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal.

Certains parasites peuvent coloniser l'intestin en détruisant l'épithélium gastro-intestinal par le biais de la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire. En



relation avec cette activité, le parasite excrète une enzyme, la hyaluronidase, qui va faciliter l'hydrolyse des tissus et l'invasion de la muqueuse en dépolymérisant l'acide hyaluronique. L'étape d'invasion gastro-intestinale peut être mise en évidence par une augmentation de la quantité de hyaluronidase dans les urines (Hotez *et al.*, 1994). Chandramathi et collaborateurs (2010) ont effectivement mis en évidence dans les urines de rats Sprague-Dowley infectés par des kystes d'un isolat symptomatique, une augmentation significative du taux de hyaluronidase durant les 30 jours suivant l'infection, suggérant une activité invasive du parasite (Chandramathi *et al.*, 2010c). Cette activité est également soutenue par l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 dans le sérum des rats infectés. L'élévation significative du stress oxydant chez des rats inoculés avec un isolat humain de *Blastocystis* sp. établit également le lien avec le choc oxydatif activé par le système immunitaire de l'hôte (Chandramathi *et al.*, 2010b).

Elwakil et Hewedi (2010) remarquent que des souris fortement infectées par un isolat symptomatique de *Blastocystis* sp. ( $4 \times 10^7$  kystes), présentent des problèmes de locomotion, une léthargie, une perte de poids, et pour certaines d'entre elles, la présence de mucus dans les fèces. Deux semaines après infection, les examens histopathologiques du gros intestin révèlent une infiltration du parasite dans la lamina propria et la muscularis mucosae (Elwakil and Hewedi, 2010). Ces observations sont accompagnées d'une intense colite, et d'une infiltration de cellules inflammatoires (lymphocytes, histiocytes, éosinophiles).

## **C. Traitements de la blastocystose**

Les traitements contre la blastocystose sont habituellement envisagés si le patient présente une diarrhée persistante et aucun autre pathogène hormis *Blastocystis* sp. dans les examens des selles. Si tel est le cas, le traitement consiste en l'administration d'une molécule antiparasitaire, le métronidazole, largement utilisée contre les protozoaires parasites anaérobies (Cassano *et al.*, 2005; Moghaddam *et al.*, 2005; Nigro *et al.*, 2003). Dans la première évaluation de l'efficacité de cette molécule, Nigro et collaborateurs (2003)



montrent que des patients immunocompétents, présentant *Blastocystis* sp. comme le seul responsable des diarrhées, répondent parfaitement au traitement, suggérant que ce parasite est capable d'induire des complications intestinales. Cependant, de nombreuses études rapportent un échec du traitement, particulièrement chez les patients comportant une infection aiguë par *Blastocystis* sp. (Haresh *et al.*, 1999; Moghaddam *et al.*, 2005; Stensvold *et al.*, 2008; Stensvold *et al.*, 2010; Yakoob *et al.*, 2004a), ce qui évoque la possible existence d'isolats résistants au métronidazole. Cette hypothèse a été confirmée par une récente étude qui fait état de la résistance d'un isolat de sous-type 7 (ST7) au métronidazole, contrairement à la sensibilité d'un autre isolat de sous-type 4 (ST4) (Mirza *et al.*, 2010).

Par ailleurs, certaines études montrent que différents isolats de *Blatocystis* sp. provenant de patients, présentent de larges différences de sensibilité au métronidazole (Haresh *et al.*, 1999), et que la forme kystique est hautement résistante à l'effet cytotoxique de cette drogue (Zaman and Zaki, 1996). Dans certaines circonstances, des antibiotiques standards (cotrimoxazole, ornidazole, nitazoxanide, paromomycine, chloroquine) peuvent être considérés comme un second choix de traitement (Cimerman *et al.*, 2003; Diaz *et al.*, 2003; Mirza *et al.*, 2010; Moghaddam *et al.*, 2005; Rossignol *et al.*, 2005; Stensvold *et al.*, 2008).

Même si certains de ces antibiotiques semblent être efficaces contre *Blastocystis* sp., des échecs thérapeutiques sont également largement rapportés. En effet, une grande variation de susceptibilité vis-à-vis de certaines drogues a été démontrée entre plusieurs isolats de sous-types différents (Mirza *et al.*, 2010).





## **II. Mitochondries et organites apparentés : témoignage du caractère événementiel et adaptatif de l'évolution**

### **A. Origine endosymbiotique de la mitochondrie**

La compréhension et le déchiffrement de l'origine de la cellule eucaryote est un des plus grands mystères de l'évolution. L'échelle évolutive de la vie sur terre, qui consiste en l'enchaînement univoque des événements ayant conduit aux différents organismes qui nous entourent aujourd'hui, est en effet très difficile à appréhender. L'évolution de la vie sur terre, dont l'apparition est estimée à environ 3,6 - 3,8 milliards, et en particulier l'évolution de la cellule eucaryote telle que nous la connaissons aujourd'hui, peut être assimilée à un palimpseste, dans lequel l'écriture des événements évolutifs les plus anciens a fait place à celle d'événements plus contemporains. Ceci constitue donc une difficulté majeure dans la compréhension de l'élaboration de la cellule eucaryote, puisque certains épisodes évolutifs sont invisibles.

Néanmoins, l'air de la génomique fournit un outil puissant dans la mise en évidence de certains événements évolutifs. En effet, la séquence ADN du génome d'organismes divers ou d'organites tels que les mitochondries ou les chloroplastes, constitue un véritable enregistrement de l'histoire évolutive de la cellule eucaryote (Hackstein *et al.*, 2006). Le travail de Woese et collaborateurs (1990), a conduit à regrouper l'ensemble des organismes vivants en 3 domaines : les eubactéries, les archaebactéries et les eucaryotes (Woese *et al.*, 1990). Les études de séquençage de nombreux génomes d'organismes appartenant à ces 3 domaines ont révélé que les génomes eucaryotes contiennent une forte contribution archaebactérienne et eubactérienne (Esser *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 1998). Bien que de nombreuses caractéristiques métaboliques soient d'origine archaebactérienne et eubactérienne, certaines, notamment structurales, sont exclusives aux eucaryotes. Ces propriétés sont liées à l'existence d'un système endomembranaire, incluant par exemple le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, et à la compartimentation de certaines voies métaboliques dans des organites à double membrane comme la mitochondrie. La question

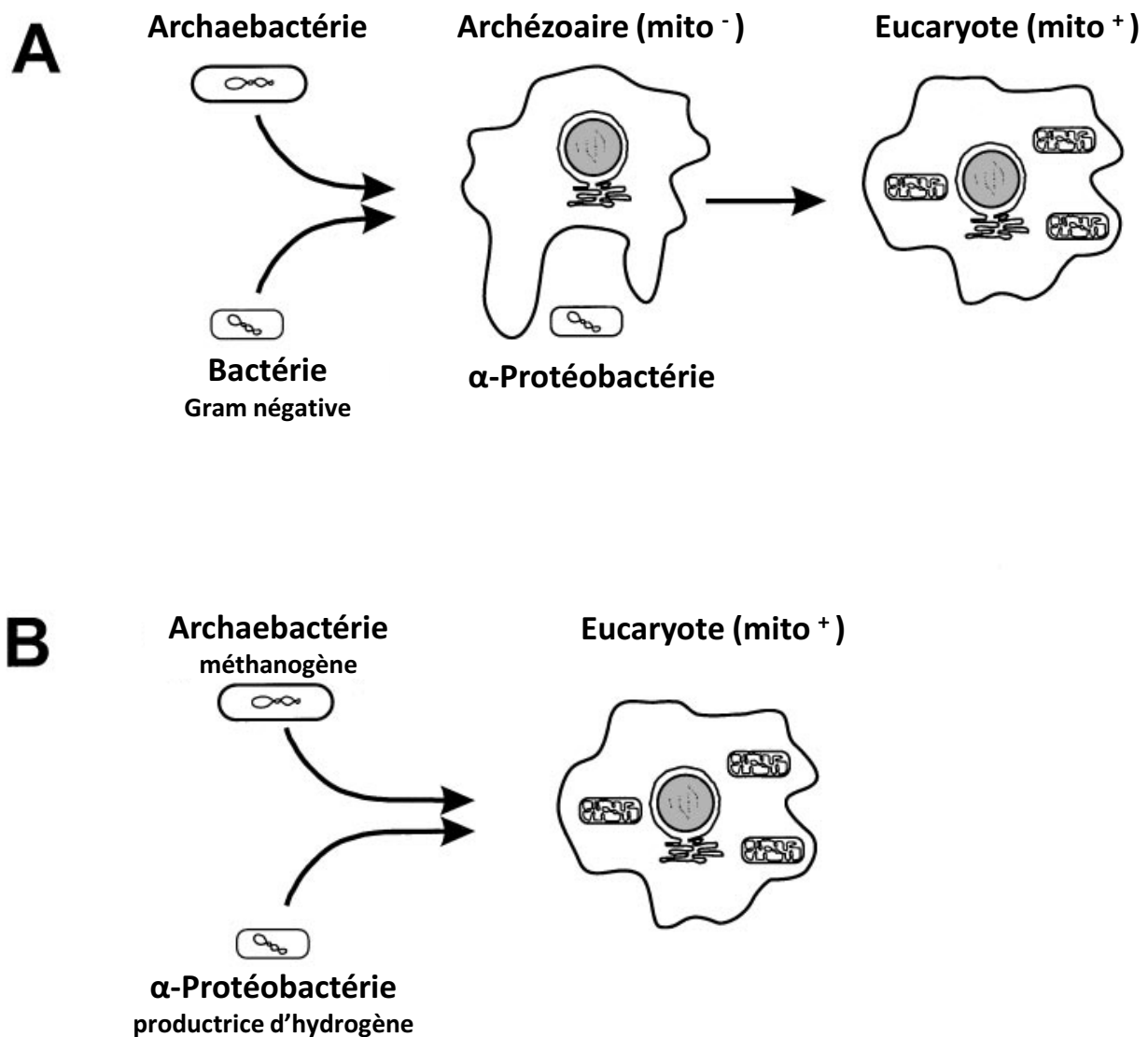


sous-jacente à ces observations est la suivante : comment la cellule eucaryote a-t-elle acquis ces propriétés qui lui sont propres, et comment ces propriétés se sont-elles diversifiées durant l'évolution de l'ensemble des organismes eucaryotes ?

L'acquisition d'un organe aussi particulier que la mitochondrie dans le processus d'évolution des eucaryotes, a certainement été un événement central dans le développement de nombreuses caractéristiques de la cellule eucaryote (Shiflett and Johnson, 2010). La mitochondrie serait, d'après la théorie de Margulis et collaborateurs le résultat d'une endosymbiose (Margulis, 1970), entre un proto-eucaryote qui aurait internalisé une bactérie. La raison pour laquelle la bactérie n'a pas été dégradée par le système enzymatique de cette cellule primitive reste un mystère, mais des intérêts mutuels auraient permis cette symbiose, conduisant même la bactérie endosymbiotique à devenir dépendante de son hôte, jusqu'à aboutir aux organites mitochondriaux que nous connaissons aujourd'hui.

Plusieurs preuves tendent à valider cette hypothèse. Il est tout d'abord intéressant de noter que seule la membrane interne mitochondriale est caractérisée par la présence d'un lipide particulier, la cardiolipine, qui est un lipide de type bactérien. La présence d'une double membrane chez la mitochondrie serait en effet le résultat du phénomène d'internalisation du procaryote, la membrane externe provenant de la membrane plasmique du proto-eucaryote, la membrane interne correspondant à la membrane de la bactérie. De plus, grâce aux analyses phylogénétiques réalisées à partir du séquençage de nombreux génomes mitochondriaux, il est actuellement admis que les mitochondries sont issues d'une  $\alpha$ -protéobactérie, et plus particulièrement de *Rickettsia prowazekii* (Andersson *et al.*, 1998; Gabaldon and Huynen, 2003, , 2004), qui est une bactérie intracellulaire obligatoire. L'ensemble de ces données répond à la question de l'identité de l'organisme qui a donné naissance à l'endosymbionte, mais qu'en est-il de l'identité du proto-eucaryote ?

Différentes théories ont été proposées pour répondre à cette question et expliquer les circonstances dans lesquelles l'eucaryote primitif a acquis cette proto-mitochondrie.



**Figure 14. Hypothèses décrivant l'origine de la cellule eucaryote.**

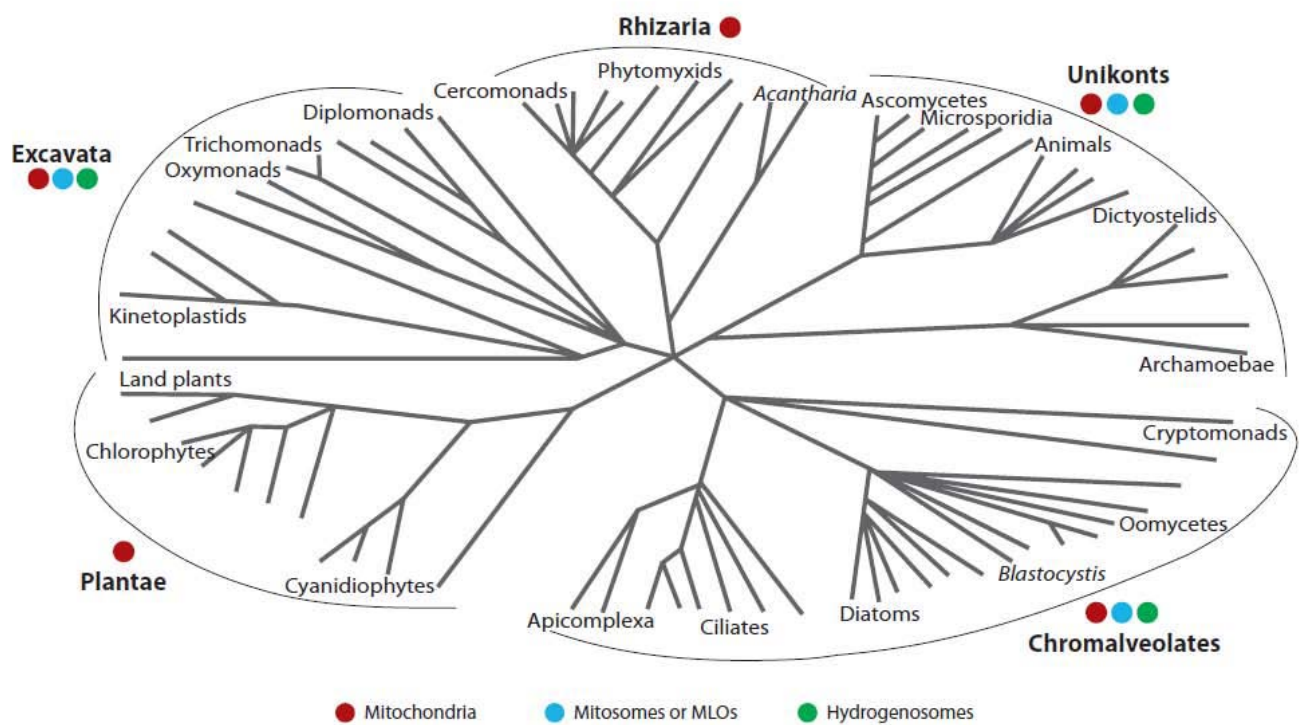
(A) Hypothèse faisant intervenir un scénario à deux étapes. La première constitue la formation d'un eucaryote primitif amitochondrial (Archézoaire mito<sup>-</sup>) par fusion entre une archaeobactérie et une bactérie Gram négative. La deuxième étape est l'acquisition d'une proto-mitochondrie par endosymbiose d'une  $\alpha$ -Protéobactérie, conduisant à la formation d'un eucaryote comportant des mitochondries (Eucaryote mito<sup>+</sup>). (B) Création simultanée de la cellule eucaryote et de la mitochondrie par fusion entre une archaeobactérie méthanogène (hôte), et une  $\alpha$ -Protéobactérie productrice d'hydrogène (symbionte). D'après Lang et al., 1999.

Certaines de ces théories postulent que le proto-eucaryote était un membre de la famille des archaebactéries (Cox *et al.*, 2008), et que l'acquisition de l'endosymbionte mitochondrial a rapidement conduit au développement des propriétés caractérisant les cellules eucaryotes actuelles. D'autres théories affirment que la plupart des caractéristiques eucaryotes, comme le noyau ou le réticulum endoplasmique, étaient déjà en place au sein du proto-eucaryote, transformant progressivement l'endosymbionte en mitochondrie (Embley and Martin, 2006).

La différence majeure entre ces théories est par conséquent le moment où cette mitochondrie primitive a été acquise. La première suggère l'inexistence de cellule eucaryote « vraie » avant le phénomène d'endosymbiose. A l'inverse, la deuxième prétend que la cellule eucaryote existait déjà, avant même l'événement d'endosymbiose mitochondriale (Figure 14).

Les premières constructions de l'arbre phylogénétique du vivant ont conduit à l'identification d'organismes unicellulaires eucaryotes particuliers, apparemment dépourvus de mitochondries, et considérés comme étant les preuves vivantes de l'existence de cellules eucaryotes avant la symbiose mitochondriale (Figure 14). Cavalier-Smith décide par conséquent de créer un taxon paraphylétique, situé à la base de l'arbre évolutif eucaryote, afin de regrouper ces organismes sous le nom d'Archézoaires (Cavalier-Smith, 1987). Les Archézoaires sont représentés entre autres par des parasites intracellulaires obligatoires comme les microsporidies (*Encephalitozoon* sp.), et des parasites microaérophiles humains tels que les amoebozoaires (*Entamoeba* sp.), les diplomonadines (*Giardia* sp.), ou les parabasalides (*Trichomonas* sp.) (Hjort *et al.*, 2010).

Cependant, les études moléculaires et phylogénétiques des quinze dernières années montrent que l'ensemble des archézoaires étudiés jusqu'ici possèdent tous des organites à double membrane ayant une origine mitochondriale (Embley and Martin, 2006). Ces données invalident donc l'hypothèse des archézoaires, et suggèrent fortement que la



**Figure 15. L'ensemble des eucaryotes comportent des organites dérivés des mitochondries.**

Les eucaryotes peuvent être divisés en 5 groupes majeurs. Tous comportent des mitochondries (en rouge), des mitosomes et des MLOs (en bleu), ou des hydrogénosomes (en vert). *D'après Shiflett et Johnson, 2010.*

présence d'une mitochondrie ou d'un homologue mitochondrial est une propriété eucaryote (Figure 15).

Ces organismes, anaérobies ou microaérophiles pour la plupart, comportent en effet des organites qui possèdent des propriétés particulières, mais tous semblent dériver d'une mitochondrie ancestrale. Ces descendants mitochondriaux sont connus sous le nom d'hydrogénosomes, de mitosomes, ou de MLOs (Mitochondrion-Like Organelle) (Shiflett and Johnson, 2010). Les caractéristiques de ces différents organites feront l'objet d'une investigation approfondie dans la suite de cette étude bibliographique, où nous verrons que la mitochondrie n'est pas une entité figée, mais que celle-ci témoigne d'une formidable diversité morphologique et métabolique.

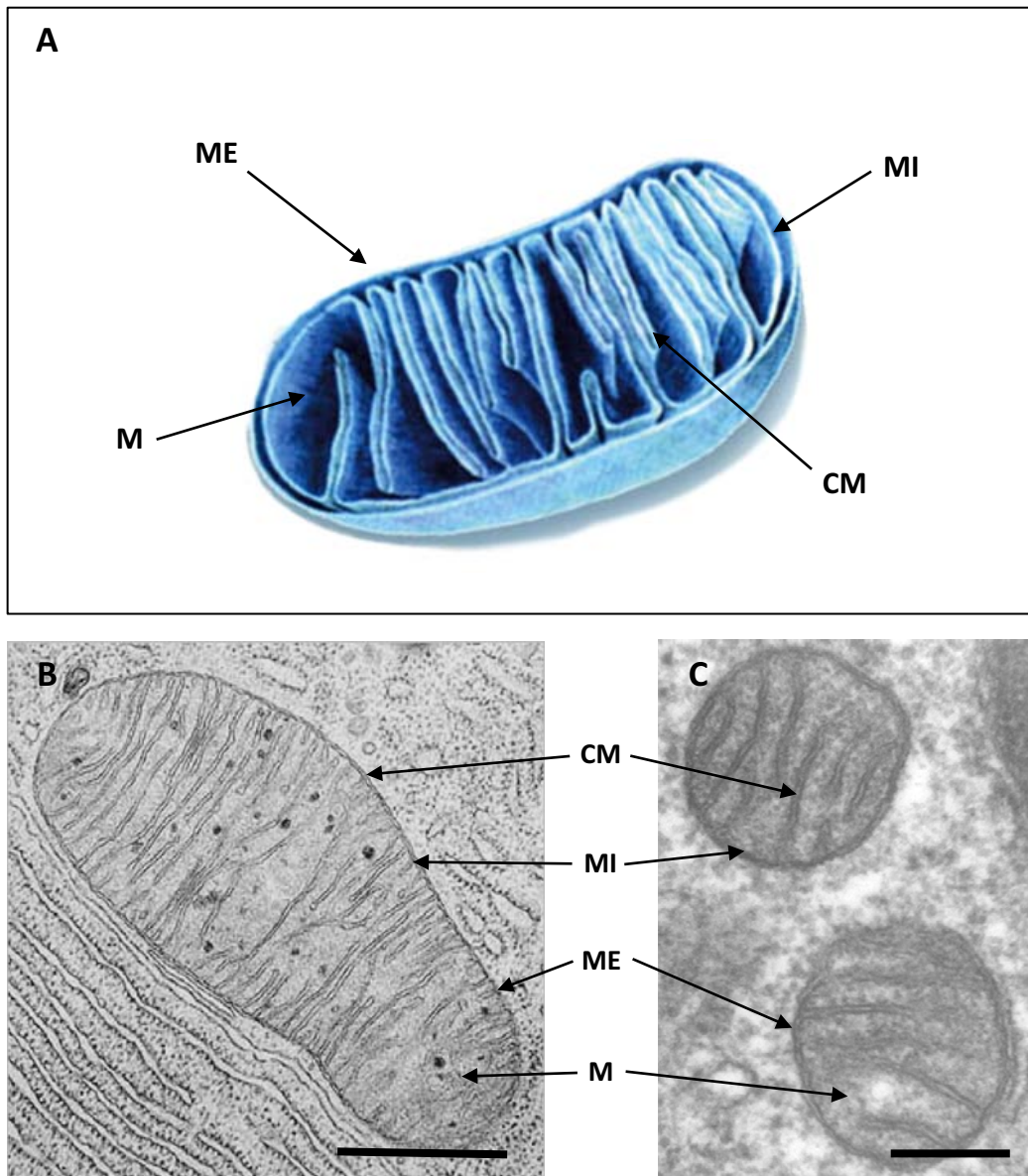
## **B. La mitochondrie : un organite polymorphe aux capacités métaboliques multiples**

### **B.1 La mitochondrie aérobie « textbook »**

#### *B.1.1 Une morphologie singulière*

La mitochondrie, d'une taille moyenne d'environ 1  $\mu\text{m}$ , est l'un des premiers organites observés en microscopie électronique, et la volonté de déchiffrer sa structure commence dès le début des années 1950. Ainsi Palade (1952), identifie la présence d'une membrane externe et d'une membrane interne, celle-ci formant des sortes de replis, qu'il appellera crêtes mitochondriales. Le modèle schématique de la mitochondrie, couramment utilisé dans les ouvrages scolaires, est essentiellement celui de Palade (Frey *et al.*, 2002). Nous avons tous en tête ce schéma dans lequel la mitochondrie est délimitée par une double membrane (une membrane externe et une membrane interne), la membrane interne formant des crêtes mitochondriales tubulaires et aplaties. Les membranes externes et internes définissent deux compartiments : l'espace inter-membranaire délimité par les deux





**Figure 16. Morphologies de la mitochondrie aérobie.**

(A) Schéma classique de la mitochondrie « textbook » délimitée par une double membrane, la membrane interne formant des crêtes mitochondriales tubulaires et aplaties. Les membranes externes et internes définissent deux compartiments, l'espace intermembranaire délimité par les deux membranes, et la matrice, délimitée par la membrane interne. (B, C) Types morphologiques rencontrés lors de l'observation en MET d'une mitochondrie. Abréviations : CM, crêtes mitochondriales; M, matrice; ME, membrane externe; MI, membrane interne. Echelle : 1  $\mu$ m (B), 500 nm (C). Sources : (A) <http://www.nutranews.org>, (B, C) <http://www2.ulg.ac.be>.

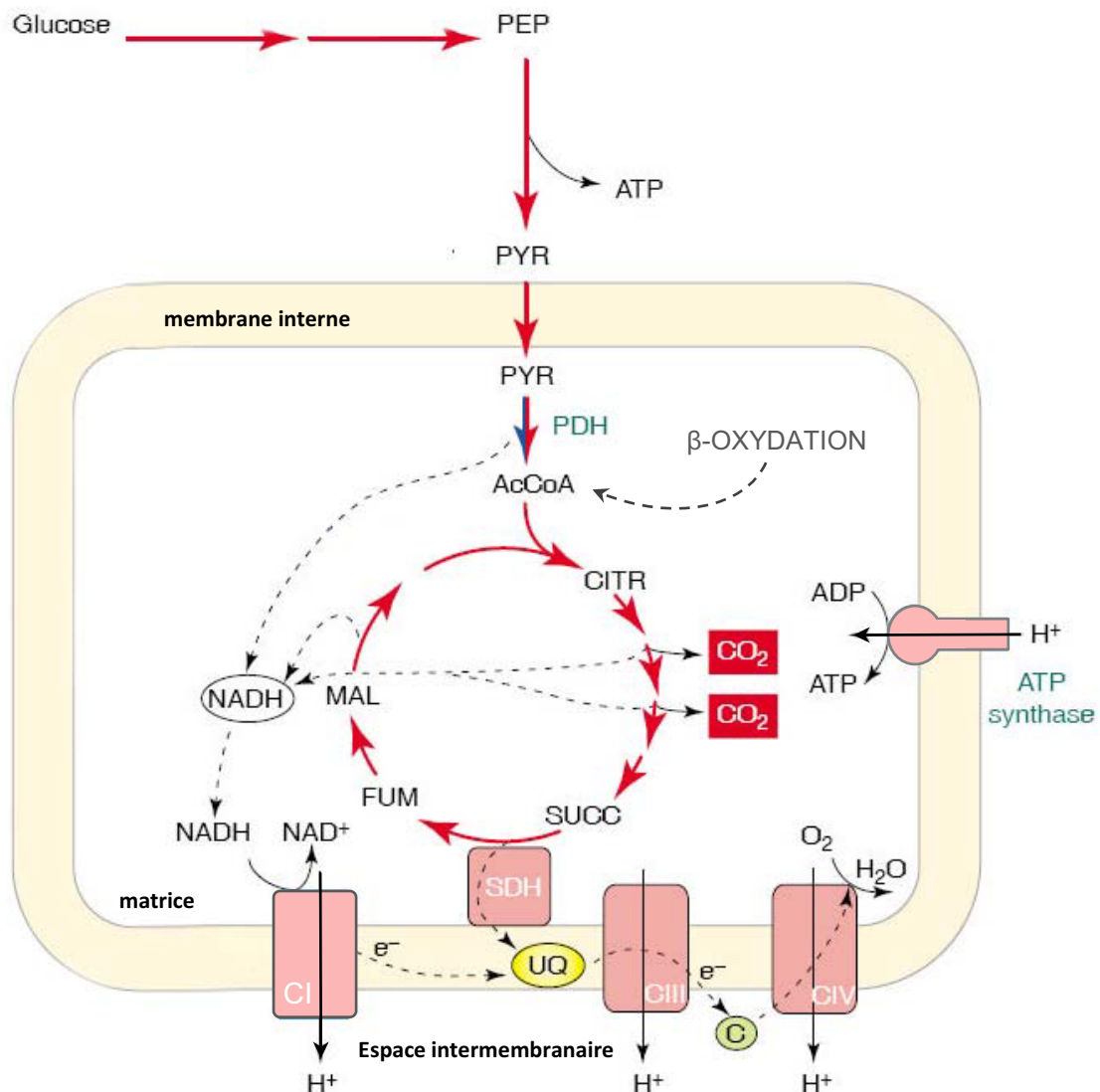
membranes, et la matrice, délimitée par la membrane interne dans laquelle baignent les crêtes (Figure 16A).

Le mot mitochondrie dérive du grec *mitos*, « filament », et *chondros*, « grain » en raison de l'aspect morphologique différent que peut prendre cet organite en fonction des tissus observés (Figure 16B et 16C). Chez les mammifères par exemple, les mitochondries rencontrées dans les cellules de tissus producteurs d'hormones stéroïdiennes, comme le tissu cortico-surrénalien ou les gonades, ont une forme allongée et peuvent mesurer jusqu'à 6 µm de longueur. A l'inverse, les mitochondries hépatocytaires présentent plutôt une forme sphérique d'environ 1 µm de diamètre. Le nombre de mitochondries par cellule est variable, et peut être relativement important dans certains cas, suivant le besoin énergétique de la cellule. Dans le foie et le cœur par exemple, chaque cellule peut comporter de 1000 à 2000 mitochondries, ce qui représente plus de 20% du volume cellulaire total (de Souza *et al.*, 2009).

### *B.1.2 Un Rôle métabolique essentiel*

La mitochondrie, dont le rôle principal est de produire de l'énergie sous forme d'ATP, est généralement perçue comme étant la centrale énergétique de la cellule eucaryote. Pourtant, cet organite joue également un rôle clef dans le phénomène d'apoptose, la  $\beta$ -oxydation des acides gras, l'assemblage des protéines à centre Fer-Soufre (Fe/S) et hémiques, la synthèse des hormones stéroïdes, et l'homéostasie du calcium de la cellule (van der Giezen and Tovar, 2005). Les dysfonctionnements mitochondriaux conduisent très souvent chez l'homme, à des complications liées à l'âge, ou à certaines pathologies sévères, comme des neuropathies, des myopathies, des cardiopathies, ou des cancers (Wallace, 2005), témoignant du rôle primordial de la mitochondrie dans la physiologie de la cellule eucaryote.

Intéressons nous maintenant plus particulièrement à la fonction prépondérante de la mitochondrie, qui réside dans la production d'énergie sous forme d'ATP grâce à un



**Figure 17. Métabolisme d'une mitochondrie aérobie.**

Le cycle de Krebs est schématisé en rouge, les complexes de la chaîne de phosphorylation oxydative en rose. Le transit des électrons à l'intérieur de la chaîne respiratoire est tracé en pointillés. Abréviations : AcCoA, acétyl-CoA; C, cytochrome c; CI, complexe I; CIII, complexe III; CIV, complexe IV; CITR, citrate; FUM, fumarate; MAL, malate; OXAC, oxaloacétate; PDH, pyruvate déshydrogénase; PEP, phosphoénolpyruvate; PYR, pyruvate; SDH, succinate déshydrogénase (complexe II); SUCC, succinate; UQ, ubiquinone. *Modifiée d'après Tielens et al., 2002.*

processus respiratoire consommant de l'O<sub>2</sub>. On estime chez les mammifères qu'environ 90% de l'oxygène consommé est utilisé par les mitochondries, afin de fournir l'énergie nécessaire à la croissance cellulaire, et aux diverses activités métaboliques de l'organisme. En effet, la mitochondrie dite « traditionnelle » fonctionne en aérobose, et requiert donc de l'oxygène pour son fonctionnement. La production d'énergie est réalisée grâce à une série de réactions biochimiques complexes faisant intervenir le cycle de Krebs, une chaîne de transporteurs d'électrons, et une ATP synthétase responsable de la production d'ATP (Figure 17).

Pour cela, la mitochondrie va tout d'abord importer le pyruvate produit par la glycolyse, afin d'alimenter le cycle de Krebs en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA). Cette étape de décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA est assurée par une enzyme caractéristique des mitochondries, la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'oxydation complète de l'acétyl-CoA par le cycle de Krebs va conduire à la formation de CO<sub>2</sub>, mais aussi de cofacteurs sous forme réduite comme le NADH. Ce pool de NADH, également produit par la  $\beta$ -oxydation des acides gras, va être oxydé grâce à la chaîne de phosphorylation oxydative, plus communément appelée chaîne respiratoire. Cette chaîne de transporteurs d'électrons, localisée au niveau des crêtes formées par la membrane interne, est composée de 4 complexes protéiques transmembranaires (Figure 17), connus sous le nom de complexe I (NADH déshydrogénase), complexe II (succinate déshydrogénase), complexe III (complexe *bc<sub>1</sub>*) et complexe IV (cytochrome c oxydase), le complexe II intervenant dans la réaction d'oxydation du succinate en fumarate au cours du cycle de Krebs. La chaîne respiratoire fait aussi intervenir d'autres composants essentiels, responsables du transit des électrons entre les différents complexes. Il s'agit du coenzyme Q, également appelé ubiquinone, situé dans la membrane interne, et du cytochrome c, localisé à la surface externe de la membrane interne.

Les complexes I et II, en oxydant le NADH et le succinate respectivement, sont les complexes producteurs et initiateurs du flux d'électrons. Les électrons sont ensuite pris en charge de manière séquentielle par l'ubiquinone, le complexe III, le cytochrome c, puis le complexe IV, celui-ci permettant la réduction d'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O. Durant le processus de transit des électrons du NADH vers l'oxygène moléculaire, chacun des complexes I, III et IV catalyse la



translocation de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire, conduisant à la formation d'un gradient électrochimique (Pedersen, 1999). Ce potentiel transmembranaire va ensuite être utilisé par une ATP synthétase, responsable de la production d'ATP à partir d'ADP (Figure 17). Il semble donc que la production d'ATP de la cellule par des mitochondries dites « classiques » soit impossible en absence d'oxygène. Nous verrons pourtant, au cours des paragraphes qui vont suivre, que la vision classique que l'on peut avoir de la mitochondrie est bien limitée, comparée à la formidable diversité génétique, morphologique et métabolique dont peut faire preuve cet organe.

### ***B.1.3 Le génome mitochondrial : évolution et diversité***

#### ***B.1.3.1 Une évolution complexe***

Toutes les mitochondries étudiées à l'heure actuelle abritent leur propre génome, qui code pour au moins une partie des sous-unités protéiques des complexes de la chaîne respiratoire (Hackstein *et al.*, 2006). Les gènes portés par ce génome ne sont généralement pas retrouvés dans le génome de la cellule eucaryote, faisant du génome mitochondrial un élément essentiel au bon fonctionnement de l'organe. Les analyses phylogénétiques réalisées à partir de la séquence de plus de 800 génomes mitochondriaux, révèlent de manière certaine, que ceux-ci dérivent d'un ancêtre de nature  $\alpha$ -protéobactérienne (Andersson *et al.*, 1998; Gabaldon and Huynen, 2003, , 2004).

Le séquençage de nombreuses souches d'  $\alpha$ -protéobactéries révèle une capacité codante de leurs génomes d'environ 1000 gènes. Il est toutefois impossible d'établir une corrélation entre le nombre de gènes présents chez les  $\alpha$ -protéobactéries actuelles, et le nombre de gènes présents dans la proto-mitochondrie ancestrale, étant donné que cet ancêtre a vécu il y a plus de 2 milliards d'années. Néanmoins, la capacité codante des différents génomes mitochondriaux connus à ce jour est comprise entre 3 et 96 gènes, suggérant que les mitochondries n'ont conservé qu'une faible partie des gènes présents



chez l' $\alpha$ -protéobactérie ancestrale, durant le processus de transition endosymbionte-organite.

Bien entendu, un organite aussi complexe qu'une mitochondrie est constitué d'un nombre beaucoup plus important de protéines, ce qui implique que la majorité des gènes soient portés par le génome nucléaire de la cellule. Des analyses de protéomique menées sur le protéome de la mitochondrie de *Saccharomyces cerevisiae*, dont le génome mitochondrial code pour seulement 19 protéines, ont mis en évidence la présence d'au moins 750 protéines. La plupart de ces protéines sont donc codées par le génome nucléaire, puis synthétisées dans le cytoplasme avant d'être importées à la mitochondrie (Sickmann *et al.*, 2003). De manière surprenante, seul un dixième des protéines mitochondriales est d'origine  $\alpha$ -protéobactérienne (Karlberg *et al.*, 2000). Ainsi, l'évolution mitochondriale à partir d'une  $\alpha$ -protéobactérie ancestrale n'implique pas seulement un transfert de gènes du génome de l'organite vers le génome nucléaire, mais aussi l'acquisition de gènes d'origines différentes (Kurland and Andersson, 2000). La présence de gènes provenant d'eubactéries et codant pour des protéines mitochondriales a également été démontrée (Embley and Martin, 2006), semant d'avantage le doute sur l'explication évolutive de la présence de protéines mitochondriales non- $\alpha$ -protéobactériennes. Toutefois, l'ensemble de la communauté scientifique s'accorde à dire que l'ADN mitochondrial a pour origine le génome d'une  $\alpha$ -protéobactérie ancestrale.

#### *B.1.3.2 Une importante diversité génétique et structurale*

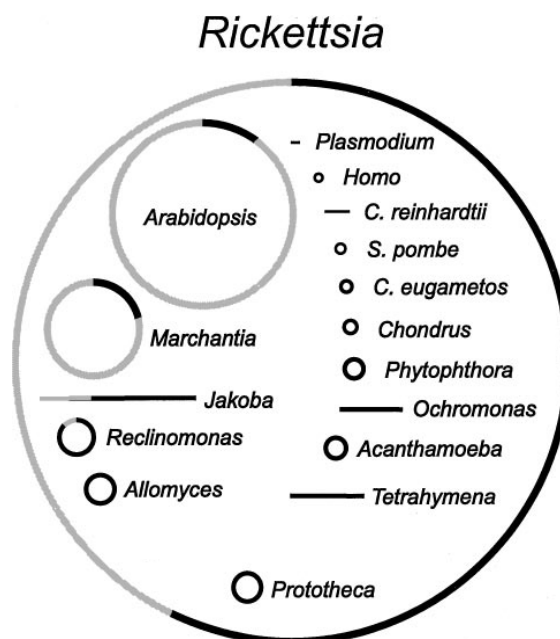
En dépit de l'existence d'un ancêtre commun, les génomes mitochondriaux présentent une extraordinaire diversité. La quantité d'informations grandissantes fournie par les données de séquençage du génome mitochondrial de centaines d'espèces eucaryotes (animaux, champignons, protistes), dévoile en effet une très grande diversité, en terme de taille, de structure et de contenu en gènes. Cependant, des propriétés communes et prédominantes sont retrouvées dans tous les génomes mitochondriaux connus à ce jour.



Functions	Genes
Electron transport and ATP synthesis	
NADH dehydrogenase	<i>nad1,2,3,4,4L,5,6,7,8,9,10,11</i>
Succinate dehydrogenase	<i>sdh2,3,4</i>
Cytochrome bc <sub>1</sub> -complex	<i>cob</i>
Cytochrome c oxidase	<i>cox1,2,3</i>
ATP synthase	<i>atp1,3,4 (ymf39) , atp8 (ymf19) , atp9</i>
Translation	
Ribosomal RNAs	<i>rns, rnl, rm5</i>
Transfer RNAs	<i>trnA,C, ... W,Y</i>
Ribosomal proteins	<i>rps1,2,3 (var1) ,rps4,7,8,10,11,12,13,14,19</i> <i>rpl1,2,5,6,10,11,14,16,18,19,20,27,31,32,36</i>
Elongation factor Tu	<i>tufA</i>
tmRNA (unstalling of translation)	<i>ssrA</i>
Transcription	
Core RNA polymerase	<i>rpoA,B,C</i>
Sigma factor	<i>rpoD</i>
Protein import	
ABC transporter	<i>ccmB (yejV), ccmA (yejW)</i>
Heme delivery	<i>ccmC (yejU)</i>
SecY-type transporter	<i>secY</i>
Sec-independent transporter	<i>tatA (mttA) , tatC (mttB; ymf16)</i>
Protein maturation	
Cytochrome oxidase assembly	<i>cox11</i>
Heme c maturation	<i>ccmF (yejR)</i>
RNA processing	
RNase P (5' tRNA processing)	<i>rnpB</i>

**Figure 18. Ensemble des gènes pouvant être retrouvés sur le génome mitochondrial.**

Les protéines codées par les génomes mitochondriaux sont préférentiellement impliquées dans la chaîne de phosphorylation oxydative et dans la machinerie de traduction. De manière moins fréquente, certains génomes mitochondriaux semblent également contenir l'information génétique impliquée dans les phénomènes de transcription, d'import et de maturation des protéines. *D'après Gray et al., 2004.*



**Figure 19. Comparaison du génome mitochondrial de quelques eucaryotes avec le génome de l' $\alpha$ -protéobactérie *Rickettsia*.** Les cercles et les lignes représentent respectivement la forme circulaire et la forme linéaire des génomes représentés. Pour les génomes d'une taille d'au moins 60 kpb, la proportion d'ADN codant pour des gènes à fonctions connues (en noire), est différenciée de celle comportant des gènes à fonctions inconnues et des régions intergéniques (en grise). *D'après Lang et al., 1999.*

La caractéristique distinctive majeure de l'ADN mitochondrial par rapport au génome nucléaire est le faible pourcentage en guanine et cytosine (G/C %). Cette richesse en adénine (A) et thymine (T) serait corrélée à l'adaptation au mode de vie intracellulaire. Nous pouvons citer à titre d'exemple celui de certaines eubactéries endosymbiotiques, qui présentent un G/C % plus faible que leurs homologues vivant librement. La deuxième caractéristique commune majeure réside dans le fait que les gènes portés par l'ADN mitochondrial sont impliqués dans un ensemble relativement constant de processus biologiques mitochondriaux (Gray *et al.*, 2004). Il s'agit principalement de la chaîne de phosphorylation oxydative, de la machinerie de traduction, et de manière moins habituelle de mécanismes d'import et de maturation des protéines (Figure 18). Les raisons pour lesquelles certains gènes n'ont jamais été transférés dans le génome nucléaire sont inconnues. Néanmoins, deux théories principales ont été émises afin d'expliquer la rétention du génome par la mitochondrie. La première, appelée théorie de l'hydrophobicité, fait état de l'hydrophobicité de certaines protéines mitochondriales, qui empêcherait leur import à l'organite si celles-ci étaient traduites dans le cytoplasme, impliquant une expression au sein même de la mitochondrie. La deuxième théorie suggère que l'état redox de la mitochondrie permettrait une régulation fine de l'expression de son génome, permettant une réactivité métabolique accrue (van der Giezen and Tovar, 2005).

Bien que les génomes mitochondriaux présentent une certaine constance fonctionnelle, leur nombre de gènes, ainsi que leur taille, peuvent extrêmement varier selon le groupe eucaryote considéré. Il est également intéressant de noter que le génome des mitochondries peut être linéaire ou circulaire suivant l'organisme étudié (Figure 19). Ainsi, l'ADN mitochondrial de l'apicomplexe parasite *Plasmodium* sp., ayant une taille de 6 kpb, ne comporte que 3 gènes (Vaidya and Mather, 2009), alors que certains génomes mitochondriaux de plantes, atteignant parfois une taille de 570 kpb pour le maïs (Clifton *et al.*, 2004), peuvent présenter plus de 100 gènes. Néanmoins, la plupart des génomes mitochondriaux de plantes n'ont qu'une faible densité génique (environ un gène pour 8 kpb). Ils sont plutôt composés d'introns, de pseudogènes et d'ORF inconnus. Cette structure



particulière est essentiellement due à une évolution génomique rapide de la mitochondrie, et à une forte activité de recombinaison (Lang *et al.*, 1999).

Chez *Arabidopsis thaliana* par exemple, le génome mitochondrial a une taille de 367 kpb, et comporte 57 gènes (33 codant des protéines, 3 codant des ARN ribosomaux et 21 codant des ARN de transfert), ne couvrant que 10% du génome. Les protéines codées par cet ADN mitochondrial sont pour la plupart des protéines ribosomales et des sous-unités entrant dans la composition des complexes de la chaîne respiratoire. Cet ADN est également constitué de 74 ORF de plus de 300 pb sans homologie particulière avec des gènes connus, représentant 10% de la séquence. Les 80% restants sont représentés par des zones répétées, des introns, et des séquences inconnues (Unsold *et al.*, 1997).

Le génome mitochondrial des animaux ou des insectes est beaucoup plus petit, puisqu'il présente une taille moyenne d'environ 16 kpb (celui de champignons tels que la levure *Saccharomyces cerevisiae* a une taille de 86 kpb). En dehors de quelques rares exceptions, il comporte 37 gènes, incluant peu d'introns, codant pour les ARN ribosomaux des petite et grande sous-unités, 13 protéines codant pour certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire, et 22 ARN de transfert (Lang *et al.*, 1999).

Le groupe des eucaryotes unicellulaires représente la plus grande diversité génétique et structurale des génomes mitochondriaux. Le clade des Alvéolés (ou Alveolata) et l'ordre des Kinétoplastidés renferment de nombreux exemples d'organismes les plus frappants concernant la diversité du génome mitochondrial. Les trois groupes majeurs des Alvéolés (Ciliés, Dinoflagellés et Apicomplexes) comportent des génomes mitochondriaux très divergents en terme d'organisation et de contenu génique. Les Ciliés possèdent les plus grands génomes mitochondriaux des trois groupes. *Tetrahymena* sp. possède en effet un génome mitochondrial sous forme linéaire, d'environ 47 kpb, codant pour 45 gènes (Brunk *et al.*, 2003). De manière surprenante, parmi ces 45 gènes, 20 codent pour des protéines à fonctions inconnues, et semblent être limités aux Ciliés. Cette particularité devient moins insolite, lorsque l'on considère *Reclinomonas americana*, qui détient le record du plus grand



génom mitochondrial (69 kpb), et du plus grand nombre de gènes (97 dont 96 sont assignés à une fonction biologique) (Lang *et al.*, 1997). Cette divergence de contenu génique des génomes mitochondriaux des Ciliés est néanmoins mal comprise.

Le génome mitochondrial des Dinoflagellés possède quant à lui beaucoup moins de gènes, puisque celui-ci code pour seulement 3 protéines, impliquées dans la chaîne respiratoire (Cox1, Cox3, Cytb). Certaines séquences correspondent à des fragments de gènes codant pour de l'ARN ribosomal. Les gènes sont flanqués par des séquences répétées inversées, qui peuvent atteindre 85% de la séquence complète du génome. Les données suggèrent que le génome mitochondrial des dinoflagellés consiste en plusieurs molécules d'ADN différentes d'environ 30 kpb, mais la forme circulaire ou linéaire de ces molécules n'est pas claire (Vaidya and Mather, 2009).

L'ADN mitochondrial des Apicomplexes présente également le même contenu génique que les Dinoflagellés, et code pour les 3 mêmes protéines (Cox1, Cox3, Cytb). Cette particularité suggère que la réduction du nombre de gènes du génome mitochondrial, a précédé la divergence qui s'est opérée entre les Apicomplexes et les Dinoflagellés. Le génome mitochondrial le plus connu parmi les Apicomplexes est celui du parasite *Plasmodium falciparum*, l'agent responsable du paludisme. Celui-ci constitue le plus petit génome mitochondrial répertorié à ce jour, avec une taille de 6 kpb. L'organisation des gènes est cependant différente de celle des Dinoflagellés. Les protéines Cox1 et Cytb sont codées par un brin de la double hélice d'ADN, alors que Cox3 est codée par l'autre brin. Il est intéressant de noter que certaines régions de ces deux brins, variant de 20 à 200 nucléotides, codent pour des fragments de l'ARN des petite et grande sous-unités ribosomales (Feagin *et al.*, 1992). Avant sa découverte, le génome mitochondrial de *Plasmodium* sp. était considéré, à tort, comme étant une molécule d'ADN circulaire de 35 kpb. Cette molécule est en fait la relique d'un génome chloroplastique, situé dans un organe particulier caractérisant les Apicomplexes et provenant d'une endosymbiose secondaire, appelé apicoplaste (Williamson *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1996).



Les différences notables du contenu génique et les réarrangements génomiques de l'ADN mitochondrial chez les Alvéolés semblent témoigner d'une remarquable plasticité de ces génomes mitochondriaux. Cette propriété est sans aucun doute nécessaire à l'adaptation de ces différents groupes de protozoaires aux diverses niches écologiques dans lesquels ils survivent. Ainsi, l'adaptation des Apicomplexes parasites tels que *Plasmodium* sp. a pu conduire à une perte des gènes de la photosynthèse présents chez l'ancêtre des Apicomplexes, conduisant à un plaste « relique » qui constitue aujourd'hui l'apicoplaste (Vaidya and Mather, 2009).

L'ADN mitochondrial des Kinétoplastidés, comprenant certains Trypanosomatidés très connus, comme *Trypanosoma* sp., est inclus dans une structure particulière située au sein de la matrice mitochondriale, que l'on appelle le kinétoplaste (nous aborderons la morphologie de cette structure de manière plus précise dans les paragraphes suivants). L'ADN du kinétoplaste (ADNk) représente près de 30% de l'ADN total de la cellule. A la différence des autres génomes mitochondriaux, l'ADNk des Trypanosomatidés est composé de plusieurs molécules d'ADN circulaires, toutes connectées entre elles, formant ainsi un réseau unique (de Souza *et al.*, 2009). Le kinétoplaste renferme deux types de molécules circulaires, en nombre variable : les maxi-cercles (quelques dizaines), et les mini-cercles (plusieurs centaines). Les mini-cercles présentent une taille d'environ 0,5 à 2,5 kpb (selon l'espèce), alors que la taille des maxi-cercles varie entre 20 et 40 kpb (Liu *et al.*, 2005; Liu and Englund, 2007; Shapiro and Englund, 1995). La structure et la fonction des maxi-cercles sont analogues à l'ADN mitochondrial classiquement retrouvé chez les eucaryotes. Ils codent en effet pour les ARN ribosomaux et certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. Les mini-cercles codent pour des « ARN guides », impliqués dans la modification de certains transcrits codés par les maxi-cercles. Ces ARNs particuliers vont conduire à l'insertion ou à la délétion d'uridyate, modifiant ainsi de manière post-transcriptionnelle, la séquence d'origine du transcrit (Stuart and Panigrahi, 2002). Ce mécanisme très particulier, est une caractéristique du génome mitochondrial des Trypanosomatidés.





Ce phénomène, connu sous le nom « d'édition de l'ARN », n'est pas propre aux mitochondries, mais demeure un processus biologique indispensable au développement et à la survie des organismes eucaryotes (Maas, 2010). Le mécanisme d'édition de l'ARN a initialement été découvert chez la mitochondrie de *Trypanosoma* sp. (Benne *et al.*, 1986).

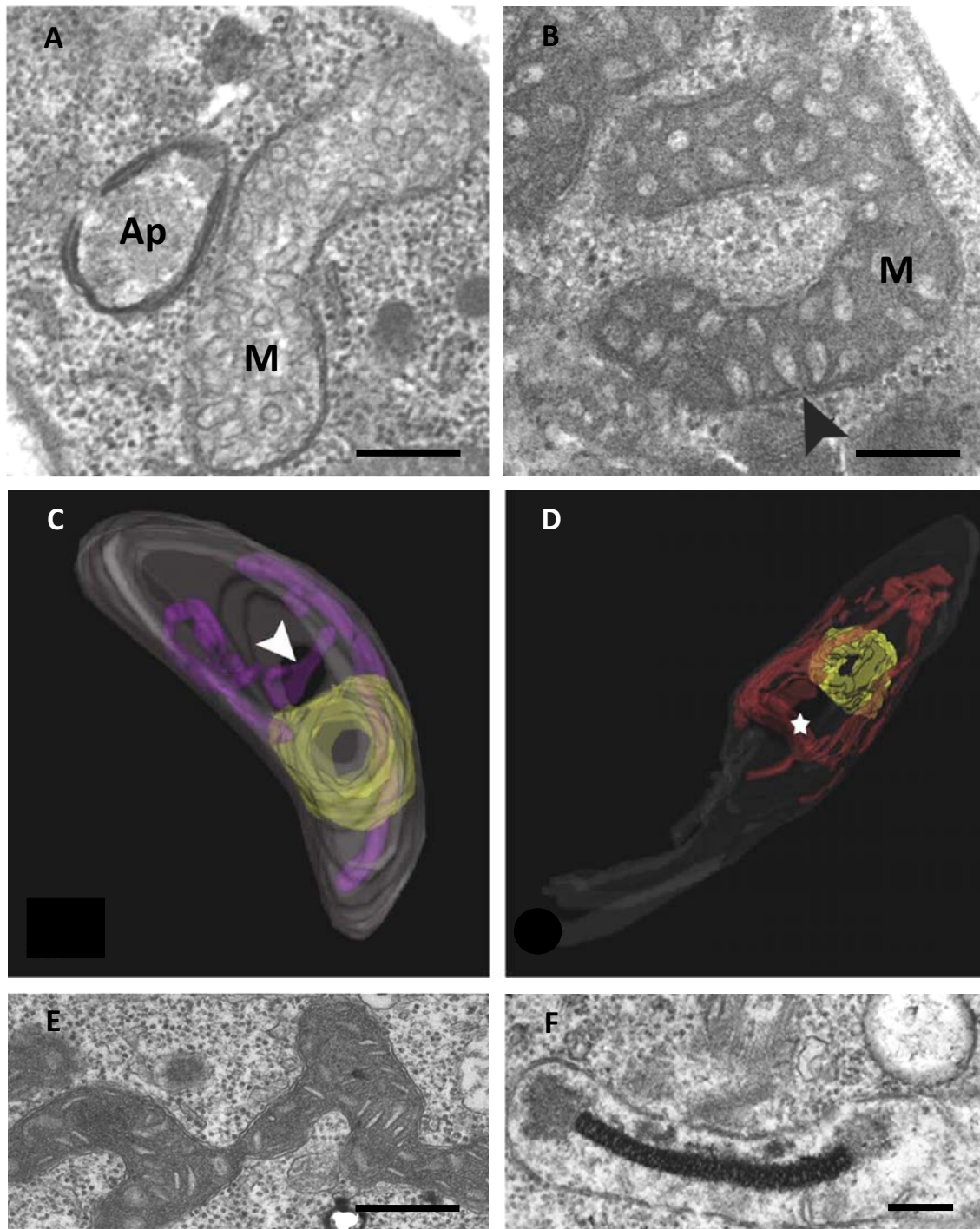
## **B.2 Hétérogénéités morphologiques et métaboliques**

Nous venons de voir qu'il existe une grande diversité génétique au sein du génome de la mitochondrie, dépendante de la lignée eucaryote considérée, mais également de l'organisme étudié. Le schéma classique de Palade (Frey *et al.*, 2002) que l'on peut avoir en tête, dans lequel cet organe ovoïde de 1 µm délimité par une double membrane contenant des crêtes, n'est qu'une vision restreinte de l'étonnante diversité morphologique et métabolique dont peut faire preuve la mitochondrie. Les mitochondries peuvent en effet fusionner, se fragmenter, en changeant leur forme et leur distribution cellulaire (Benard and Rossignol, 2008).

Tout comme nous l'avons vu pour la diversité génétique des génomes mitochondriaux, l'aspect ultrastructural des mitochondries des protistes, et notamment des protistes parasites, est assez particulier en comparaison à celui des organismes pluricellulaires. Nous prendrons donc pour illustrer la diversité morphologique et métabolique des mitochondries, l'exemple de protozoaires parasites responsables d'importantes maladies parasitaires humaines, comme les Apicomplexes *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii*, et les Trypanosomatidés *Trypanosoma brucei* et *Trypanosoma cruzi* (responsables de la maladie du sommeil et de la maladie de Chagas).

### ***B.2.1 Particularités ultrastructurales des mitochondries des Apicomplexes et des Trypanosomatidés***

Les Apicomplexes et les Trypanosomatidés (de l'ordre des Kinétoplastidés), ne possèdent qu'une seule mitochondrie au sein du cytoplasme. La particularité structurale de



**Figure 20. Morphologie de la mitochondrie des Apicomplexes et des Trypanosomatidés.**

(A et B) Observation en MET de la mitochondrie de *Plasmodium* sp. (A) et de *Toxoplasma gondii* (B). La mitochondrie (M) est souvent observée à proximité de l'apicoplaste (Ap). Noter la forme en « omega » (pointe de flèche) des crêtes mitochondriales de *T. gondii*. (C et D) Reconstruction tridimensionnelle de la mitochondrie de *T. gondii* (C), en violet, formée de deux branches latérales connectées entre elles dans la partie médiane de la cellule (pointe de flèche), et de *Trypanosoma cruzi* (D), en rouge, présentant de nombreuses ramifications ainsi qu'une zone dilatée représentant le kinétoplaste (étoile). Le noyau est en jaune. (E) Observation en MET de la mitochondrie de *Trypanosoma serpentesi*. Noter la présence de fines crêtes tubulaires, irrégulièrement distribuées. (F) Observation en MET du kinétoplaste, montrant une structure compacte dense aux électrons, correspondant à l'ADN mitochondrial. Echelle : 200 nm. D'après de Souza et al., 2009.

cette mitochondrie est qu'elle est ramifiée, occupant ainsi une partie importante du volume cellulaire. La mitochondrie de l'apicomplexe *Plasmodium* sp., présente une morphologie différente en fonction des différents stades de développement du parasite. Durant les stades asexués par exemple, la mitochondrie apparaît comme un organe unique, la plus part du temps allongé ou ramifié. Pendant la phase de schizogonie, cette mitochondrie devient très ramifiée puis elle se divise en de multiples organites en phase tardive de multiplication (van Dooren *et al.*, 2005). Les mitochondries sont très souvent observées à proximité de l'apicoplaste (Figure 20A), suggérant un échange étroit entre ces deux types d'organites (van Dooren *et al.*, 2006).

La mitochondrie du tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* présente une structure un peu différente de celle de *Plasmodium* sp. Les observations en MET montrent en effet des crêtes mitochondriales qui se présentent sous une forme en « omega » (Figure 20B). De plus, les données apportées par la reconstitution tridimensionnelle de la mitochondrie de cet Apicomplexe dévoilent une configuration particulière, en forme de H, dans laquelle deux ramifications tubulaires, parallèles à l'axe longitudinal de la cellule, sont connectées entre elles au niveau de la partie médiane du corps cellulaire (Figure 20C) (Melo *et al.*, 2000).

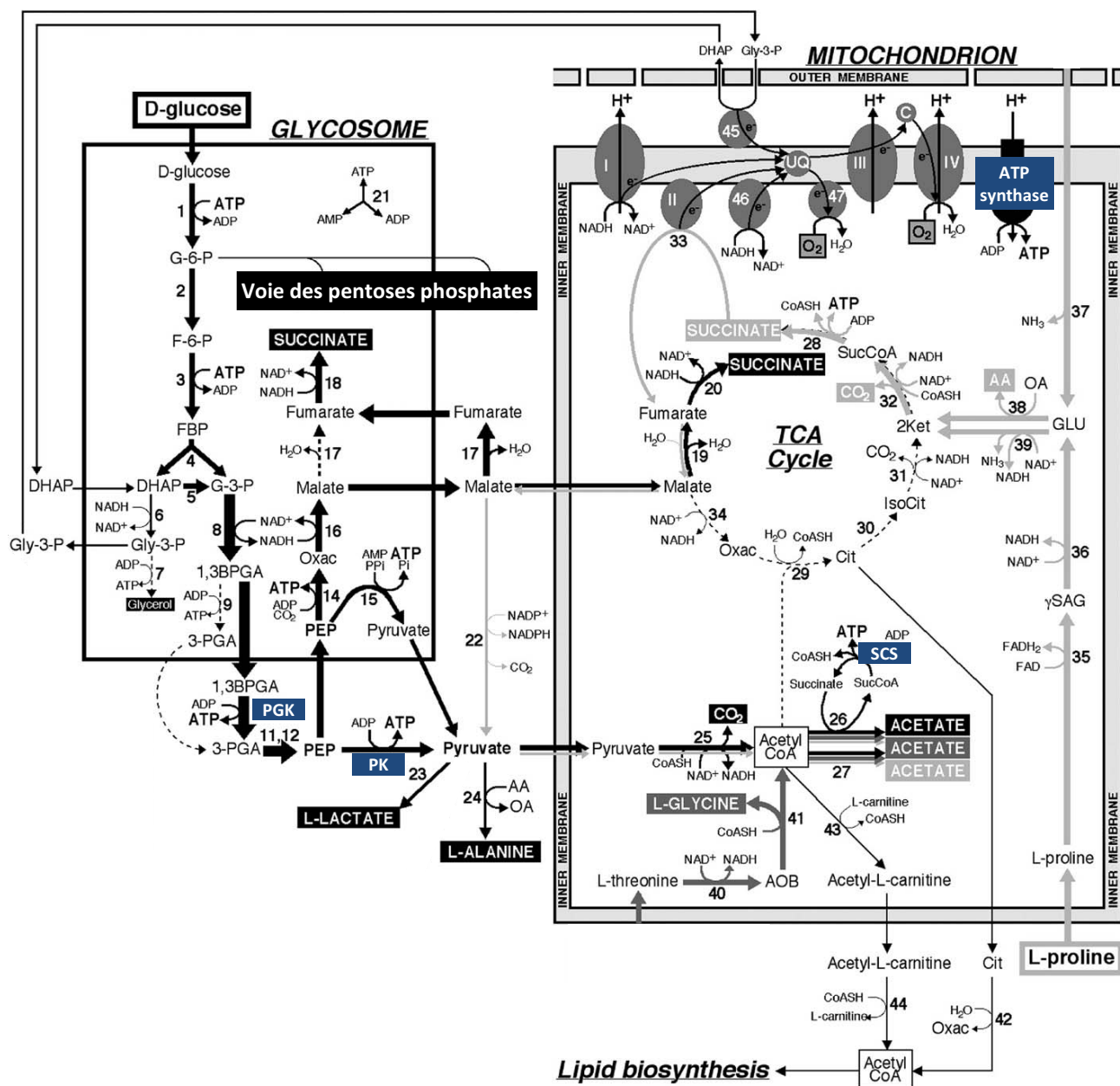
Les Trypanosomatidés ne comportent également qu'une seule mitochondrie ramifiée, située sous les microtubules subpelliculaires, présentant une région dilatée caractéristique des Kinétoplastidés, que l'on nomme le kinétoplaste (Figure 20D). Le kinétoplaste, situé dans la matrice de la mitochondrie de manière perpendiculaire à l'axe du flagelle, est la région contenant l'ADN mitochondrial. La morphologie du kinétoplaste varie selon l'espèce, et le stade de développement. Chez la majorité des Trypanosomatidés, incluant *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp., et *Trypanosoma brucei*, le kinétoplaste a une structure en forme de « barre », très dense aux électrons (Figure 20F) (de Souza *et al.*, 2009).

La mitochondrie des Trypanosomatidés consiste habituellement en une matrice dense, incluant de fines crêtes tubulaires, irrégulièrement distribuées (Figure 20E). Néanmoins, selon l'environnement et les ressources nutritives disponibles, celle-ci peut



présenter des morphologies et des tailles très différentes. *T. brucei* est certainement l'exemple le plus marquant de la plasticité morphologique dont peut faire preuve cet organisme. Dans le sang de l'hôte, le caractère pléiomorphe des trypomastigotes conduit à l'observation de formes trapues (stumpy) et de formes plus allongées (slender). La mitochondrie de la forme trapue est beaucoup plus grosse, et présente un nombre de crêtes plus important que la forme allongée. Ces différences morphologiques, notamment l'augmentation du nombre de crêtes, sont très clairement liées à l'aspect métabolique de la mitochondrie.

Cette association morphologie/métabolisme a notamment été démontrée par Böhringer et Hecker en 1975, en réalisant une étude comparative morphométrique en MET de trypomastigotes sanguins, et des formes trypomastigotes procycliques, épimastigotes et trypomastigotes métacycliques, retrouvées respectivement dans l'intestin, le proventricule et les glandes salivaires de l'insecte vecteur (*Glossina* sp.). Les auteurs montrent que la taille et l'activité métabolique de la mitochondrie des formes intestinales et proventriculaires sont maximales, bien que la concentration en glucose de ces organes soit faible. La taille et l'activité mitochondriale diminuent ensuite chez les formes métacycliques des glandes salivaires, et atteignent leur minimum chez les formes allongées du trypomastigote sanguin, où le taux de glucose est pourtant élevé. D'autre part, le volume des glycosomes, organites particuliers caractéristiques des Kinétoplastidés dans lesquels se déroule la majeure partie de la glycolyse, varie dans le sens opposé. Ces glycosomes sont en effet beaucoup plus volumineux dans les formes sanguines que dans les formes retrouvées chez l'insecte (de Souza *et al.*, 2009). La relation entre les variations morphologiques et métaboliques de la mitochondrie et des glycosomes est mise en évidence par la nature de la source de carbone présente dans le milieu. Celle-ci est effectivement différente entre l'hôte invertébré et l'hôte vertébré. La source principale de carbone rencontrée chez l'insecte se présente sous forme de proline, contrairement aux vertébrés comme l'homme, qui utilisent le glucose comme source énergétique. Lorsque le glucose est la principale source d'énergie, la mitochondrie présente une taille relativement faible, alors que les glycosomes sont nombreux et



**Figure 21. Représentation schématique du métabolisme énergétique de la forme procyclique de *Trypanosoma brucei* en fonction de la nature de la source de carbone.** Les flèches noires et gris clair représentent respectivement les voies métaboliques empruntées lors de l'utilisation de glucose ou de proline. Les flèches en pointillés indiquent les réactions supposées comporter un niveau basal. Les enzymes principalement responsables de la production d'ATP en présence de glucose (pyruvate kinase (PK), phosphoglycérate kinase (PGK), succinyl-CoA synthétase (SCS)), et en présence de proline (ATP synthase), sont représentées par un encadré à fond bleu.

**Note :** L'objectif de ce schéma est de présenter de manière globale le métabolisme énergétique de *T. brucei*, selon la nature de la source de carbone. Pour cette raison, toutes les enzymes intervenant dans ces différentes voies ne seront pas précisées. Modifiée d'après Bringaud et al., 2006.

constituent une part importante du volume cellulaire (environ 5%) (de Souza *et al.*, 2009). Les formes trypomastigotes sanguines (slender) comportent un métabolisme énergétique simple, basé uniquement sur la glycolyse, conduisant à une synthèse d'ATP cytoplasmique, le métabolisme mitochondrial ne servant qu'à maintenir l'état d'oxydoréduction de la cellule (Bringaud *et al.*, 2006).

A l'inverse, en présence de proline, la mitochondrie augmente significativement de volume, alors que le nombre de glycosomes diminue. Les nombreuses données apportées par l'étude de la forme trypomastigote procyclique de *T. brucei* (forme intestinale chez l'insecte), révèlent une adaptation du métabolisme énergétique vis-à-vis du glucose et de la proline très particulière. Son catabolisme conduit en effet à la formation de produits finaux partiellement oxydés, comme le succinate, l'acétate, ou le lactate, composés généralement retrouvés au sein d'un métabolisme de fermentation anaérobie. Toutefois, le parasite évolue dans un environnement aérobie, que ce soit chez l'insecte ou l'hôte vertébré. Afin de qualifier au mieux ce métabolisme particulier, le nom de « fermentation aérobie » lui a été donné (Bringaud *et al.*, 2006). En présence de glucose, le parasite produit son énergie indépendamment de la chaîne de phosphorylation oxydative. L'ATP est produit par phosphorylation au niveau du substrat grâce à la pyruvate kinase (PK), la phosphoglycérate kinase (PGK) cytoplasmique et la succinate-CoA synthétase (SCS) mitochondriale (Figure 21). La production mitochondriale d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat n'est habituellement rencontrée que dans des mitochondries particulières, appelées « mitochondries anaérobies » évoluant en anaérobiose. Cette production d'ATP fait intervenir la SCS, mais également une autre enzyme l'acétate:succinate-CoA transférase (ASCT) qui est caractéristique d'organites particuliers connus sous le nom d'hydrogénosomes. Les organites particuliers tels que les mitochondries anaérobies et les hydrogénosomes seront détaillés dans la suite de cette introduction bibliographique.

En présence de proline, l'ATP est cette fois produit grâce à la chaîne respiratoire, la mitochondrie prenant une place importante dans la production d'énergie (Figure 21). Bien que tous les mécanismes de régulation ne soient pas connus, la diminution de l'activité de la



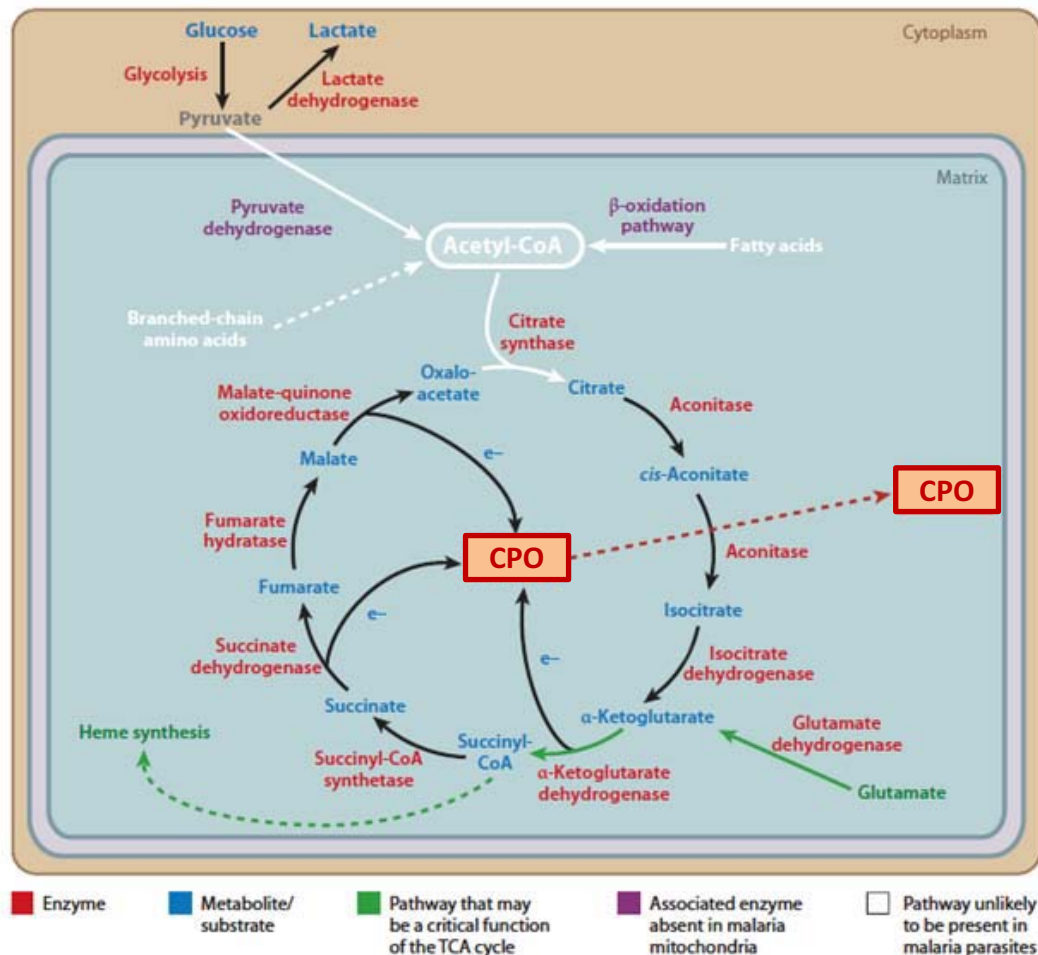


chaîne de phosphorylation oxydative, essentiellement due à l'activité d'une oxydase alternative (AOX) et du cycle de Krebs en présence de glucose, peut être expliquée par l'importante concentration de ce sucre (5 mM) dans le sang. Cette forte concentration entraîne en effet un flux glycolytique conséquent au sein du parasite, produisant suffisamment d'ATP pour les besoins physiologiques de la cellule. Le métabolisme oxydatif n'est donc pas nécessaire dans ces conditions (Bringaud *et al.*, 2006).

La mitochondrie est donc capable d'adapter sa morphologie et son métabolisme selon l'état physiologique de l'organisme, et de ses affinités pour la nature du substrat carboné présent dans le milieu. Ces observations nous montrent que le schéma classique, qui consiste à lier le catabolisme du glucose (réalisé par la glycolyse) avec la production d'ATP par la mitochondrie, est une vision partiellement erronée. En effet, les mitochondries de certains organismes, comportant un métabolisme particulier, ne sont pas systématiquement liées à la production d'énergie. Cette notion est parfaitement illustrée par l'originalité métabolique de la mitochondrie de la forme érythrocytaire de *Plasmodium* sp.

### *B.2.2 Originalité du métabolisme mitochondrial de Plasmodium*

Les rôles du cycle de Krebs et de la chaîne de phosphorylation oxydative chez la mitochondrie de la forme érythrocytaire de *Plasmodium* sp. semblent être relativement différents par rapport à une mitochondrie « traditionnelle ». Des études montrent en effet que le glucose est presque entièrement dégradé en lactate par le parasite, suggérant que le pyruvate formé par la glycolyse est préférentiellement catabolisé en lactate, et non en acétyl-CoA, molécule pourtant nécessaire au fonctionnement du cycle de Krebs. De récentes observations montrent également que le complexe PDH est exclusivement localisé dans l'apicoplaste (Foth *et al.*, 2005), fournissant une preuve supplémentaire que le cycle de Krebs ne participe pas à l'oxydation complète du glucose. La deuxième voie possible de production d'acétyl-CoA dans la mitochondrie est la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Cependant,



**Figure 22. Représentation schématique du cycle de Krebs de la mitochondrie de *Plasmodium* sp.**

L'acétyl-CoA ne semble pas être le point d'entrée du cycle de Krebs. Les voies métaboliques et les enzymes susceptibles de produire de l'acétyl-CoA (représentées en blanc) sont en effet absentes chez cette mitochondrie. Le point d'entrée principal de ce cycle semble être l' $\alpha$ -cétoglutarate, utilisé pour la production de succinyl-CoA, pouvant entrer dans la voie de biosynthèse de l'hème (figurant en vert). Abréviation : CPO, chaîne de phosphorylation oxydative. D'après Vaidya et Mather, 2009.

les données génomiques apportées par le séquençage de génomes de *Plasmodium* sp. révèlent une absence de gènes codant pour les enzymes intervenant dans cette voie. Il n'y a également aucun élément expérimental présentant une activité de dégradation des acides gras. La troisième voie métabolique pouvant conduire à la formation d'acétyl-CoA est la dégradation des acides aminés à chaîne ramifiée, grâce à l'activité enzymatique de la BCKDH (Branched-Chain Keto Acid Dehydrogenase). Malheureusement, les gènes codant pour les enzymes situées en amont de la BCKDH dans cette chaîne de biodégradation sont absents du génome (Figure 22) (Vaidya and Mather, 2009).

L'ensemble de ces données suggère fortement le fait que le cycle de Krebs de la mitochondrie de la forme érythrocytaire n'est en fait pas un cycle. Toutefois, les enzymes impliquées dans le cycle de Krebs sont codées par le génome, et à l'exception du complexe PDH, sont toutes connues ou prédites (par la présence d'une pré-séquence d'adressage) comme étant localisées dans la mitochondrie. Les études de transcriptomique révèlent de plus une expression relativement importante du gène codant la citrate synthase, une enzyme responsable de la condensation de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate en citrate. Cette expression est néanmoins mal comprise, compte tenu de l'incapacité de cette mitochondrie à produire ou à importer de l'acétyl-CoA (Vaidya and Mather, 2009).

Le point de départ majeur du cycle de Krebs chez *Plasmodium* sp. semble donc être l' $\alpha$ -cétoglutarate, produit à partir du glutamate, grâce à l'activité enzymatique d'une glutamate déshydrogénase. Le glutamate peut provenir d'un grand nombre de voies biochimiques, comme la dégradation de l'hémoglobine ou des acides aminés. Des données de métabolomique révèlent en effet un rôle primordial de l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase, dans la production de succinyl-CoA (Figure 22). Le succinyl-CoA peut ensuite être condensé avec une molécule de glycine, grâce à l'activité de la 5-aminolévulinate synthase, en 5-aminolévulinate. Cette réaction constitue la première étape de la chaîne de biosynthèse de l'hème. Le rôle principal du cycle de Krebs serait donc de permettre la synthèse de l'hème (Vaidya and Mather, 2009). Bien que la présence de résidus d'hème, issus de la dégradation de l'hémoglobine, soient observée dans la vacuole digestive, il semblerait que le parasite ait



besoin d'une production *de novo* de molécules d'hème pour assurer sa survie (Surolia and Padmanaban, 1992).

Le rôle de la chaîne respiratoire de la mitochondrie du trophozoïte de *Plasmodium* sp. semble également être différent par rapport à une mitochondrie « classique ». Dans la plupart des cellules eucaryotes, la production d'ATP par les mitochondries requiert l'existence d'une force protomotrice, formée par le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Cependant, chez les organismes favorisant un métabolisme glycolytique, comme la forme érythrocytaire de *Plasmodium* sp., le rôle de la chaîne respiratoire est souvent réduit, et la mitochondrie devient plutôt un organe consommateur d'énergie.

Chez ce parasite, le complexe I est réduit à une seule sous-unité NADH déshydrogénase, et a perdu sa fonction de pompe à protons. Ce complexe est néanmoins capable de réduire le coenzyme Q (ubiquinone). Bien que la chaîne respiratoire présente une faible activité, celle-ci semble pourtant être la source primaire du gradient électrochimique mitochondrial (Painter *et al.*, 2007), et demeure vitale pour le parasite. En effet, cette chaîne respiratoire, *via* l'ubiquinone, permet le fonctionnement de plusieurs oxydoréductases (van Dooren *et al.*, 2006), dont la DHODH (dihydroorotate déshydrogénase), qui catalyse la conversion du dihydroorotate en orotate, nécessaire à la biosynthèse *de novo* de la pyrimidine. *P. falciparum*, à l'instar de beaucoup de parasites, présente un métabolisme réduit dans lequel beaucoup de voies de biosynthèse sont absentes. Le parasite doit donc récupérer certains métabolites essentiels à partir de son hôte. Dans le cas de la pyrimidine, *P. falciparum* ne possède pas la machinerie nécessaire pour importer ce composé à partir de la cellule hôte, rendant sa biosynthèse indispensable pour le métabolisme des nucléotides. Le bon fonctionnement de la chaîne respiratoire est également essentiel aux mécanismes d'import des protéines à la mitochondrie, puisque ces processus sont dépendants du gradient électrochimique.

Il apparaît donc que la mitochondrie du trophozoïte de *Plasmodium* sp. comporte un métabolisme différent de celui habituellement rencontré chez la mitochondrie



traditionnelle. Celle-ci n'est effectivement pas liée à la production d'énergie de la cellule, mais constitue un organe essentiel dans la biosynthèse *de novo* de la pyrimidine, éléments indispensables à la survie du parasite.

Les différents exemples morphologiques et métaboliques analysés jusqu'ici sont tous liés au caractère aérobie de la mitochondrie, l'O<sub>2</sub> constituant l'accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire, permettant la synthèse d'ATP. Il semble donc que le métabolisme mitochondrial, au sens général du terme, soit impossible en absence de dioxygène, cette carence conduisant rapidement à l'altération de la production d'ATP et à la mort de la cellule. Pourtant, certains organismes comportant également des mitochondries, sont peu sensibles à l'absence d'O<sub>2</sub>, démontrant ainsi que la mitochondrie est capable de produire de l'énergie même en condition d'hypoxie ou d'anoxie.

### **B.3 Mitochondrie et environnement anaérobie**

De nombreux eucaryotes peuvent subsister en absence de dioxygène. Certains peuvent survivre en produisant leur énergie par fermentation, aboutissant à l'excrétion de lactate (fermentation lactique) ou d'éthanol (fermentation alcoolique), ou par une production d'ATP de type mitochondrial. La production d'énergie par fermentation étant cytoplasmique, nous n'en tiendrons pas compte dans la suite de ce paragraphe. Le cycle de développement de ces organismes fait en effet intervenir certains environnements, comme les sédiments marins ou le tractus intestinal des animaux, qui ne comportent pas une quantité d'O<sub>2</sub> suffisante pour permettre une production d'ATP par la chaîne respiratoire. Comment une mitochondrie privée d'oxygène peut-elle alors produire de l'énergie ? Les mitochondries des eucaryotes anaérobies produisent également de l'ATP grâce à une chaîne de transporteurs d'électrons, mais utilisent un accepteur final d'électrons différent du dioxygène. Le produit final excrété n'est donc pas de l'eau mais peut être du nitrite, du monoxyde d'azote, du succinate, ou encore du propionate (Tielens *et al.*, 2002). Ce type de





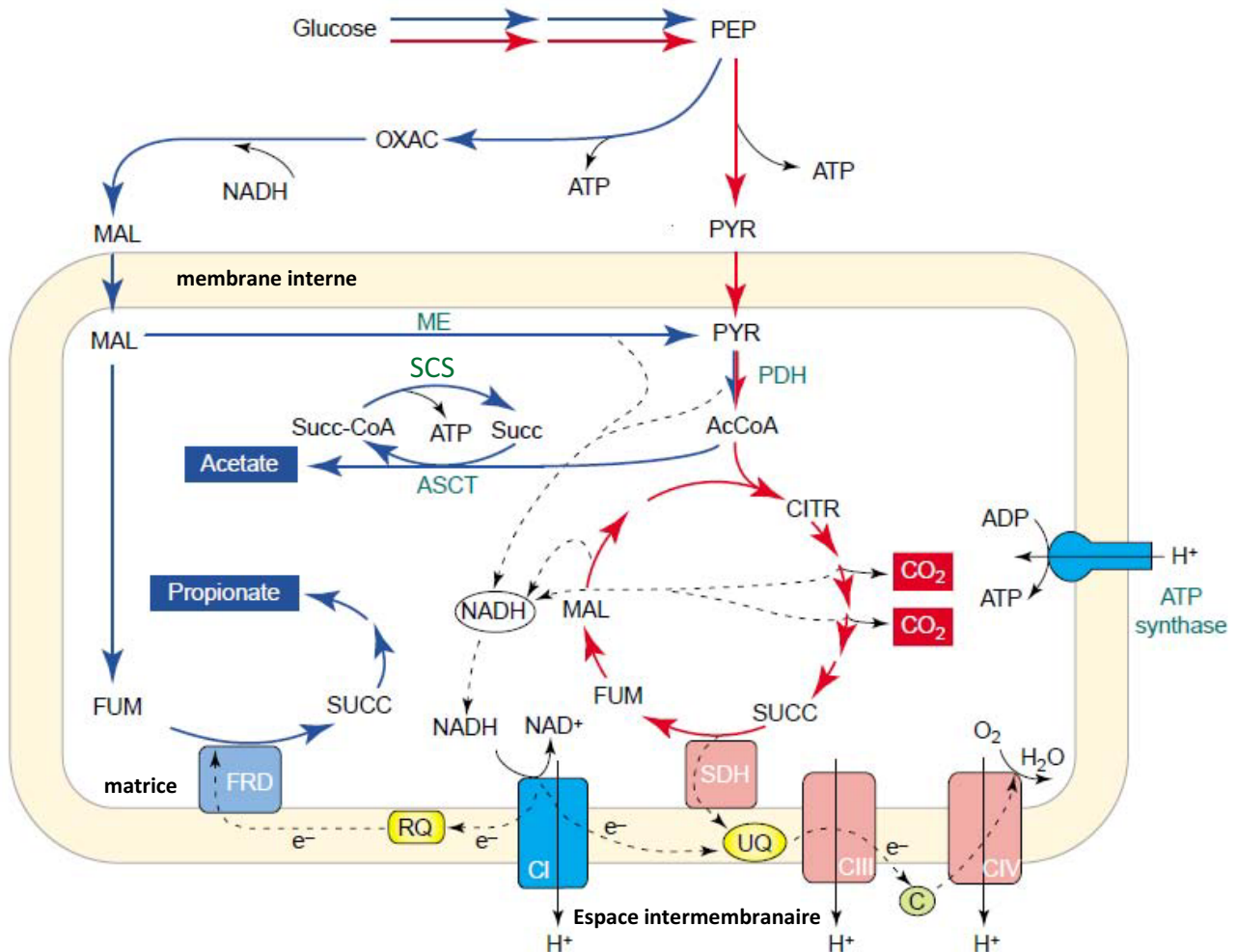
mitochondrie particulière, que l'on nomme « mitochondrie anaérobie », est retrouvé chez des eucaryotes unicellulaires (*Euglena* sp.), et pluricellulaires (vers parasites, invertébrés).

### B.3.1 La respiration des mitochondries anaérobies

Les organismes possédant des mitochondries anaérobies peuvent être divisés en deux grandes classes, suivant la nature de l'accepteur final d'électrons : ceux utilisant un composé présent dans l'environnement, comme le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) ou le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), et ceux utilisant un produit organique endogène, tel que le fumarate.

Les mitochondries anaérobies des champignons *Fusarium oxysporum* et *Cylindrocarpon tonkinense* sont d'excellents exemples de la première classe. Ces mitochondries, qualifiées de « dénitrifiantes », permettent la production d'énergie de l'organisme, grâce à la réduction du nitrite ou du nitrate en monoxyde d'azote (Kobayashi *et al.*, 1996; Takaya *et al.*, 1999). Contrairement aux mitochondries aérobies, celles-ci utilisent une chaîne de transporteurs d'électrons faisant intervenir une oxydase terminale différente du complexe IV (responsable de la réduction d' $\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ). Les mitochondries dénitrifiantes comportent en effet une nitrite réductase (NiR), capable de réduire le nitrite en monoxyde d'azote. Certaines possèdent également une nitrate réductase (NaR), permettant de réduire le nitrate en nitrite. Il est intéressant de noter que de nombreuses  $\alpha$ -protéobactéries utilisent la respiration du nitrite pour leur source d'énergie, suggérant que l'existence de ce caractère métabolique chez la mitochondrie proviendrait de l'ancêtre mitochondrial endosymbiotique (Takaya *et al.*, 1999).

Les mitochondries anaérobies des helminthes parasites *Fasciola hepatica* et *Ascaris suum* constituent des exemples de choix pour illustrer la deuxième classe. Alors que les formes libres et certaines formes larvaires comportent des mitochondries aérobies, la forme adulte de la plupart des helminthes parasites, de par le caractère anoxique de leur habitat, possède des mitochondries anaérobies utilisant le fumarate comme accepteur final d'électrons. Ceci implique l'utilisation d'une chaîne de transporteurs d'électrons spécialisée, permettant la réduction du fumarate, et d'une voie métabolique particulière, appelée « voie



**Figure 23. Comparaison du métabolisme d'une mitochondrie fonctionnant en aérobiose et en anaérobiose.** Le schéma représente le métabolisme en condition aérobie (flèches rouges) et anaérobie (flèches bleues) de la mitochondrie de l'helminthe parasite *Fasciola hepatica*. Le transit des électrons à l'intérieur de la chaîne respiratoire est tracé en pointillés et les produits finaux du métabolisme sont encadrés. Abréviations : AcCoA, acétyl-CoA; ASCT, acétate:succinate-CoA transférase; C, cytochrome c; CI, complexe I; CIII, complexe III; CIV, complexe IV; CITR, citrate; FRD, fumarate réductase; FUM, fumarate; MAL, malate; ME, enzyme malique; OXAC, oxaloacétate; PDH, pyruvate déshydrogénase; PEP, phosphoénolpyruvate; PYR, pyruvate; RQ, rholoquinone; SCS, succinyl-CoA synthétase; SDH, succinate déshydrogénase (complexe II); SUCC, succinate; Succ-CoA, succinyl-CoA; UQ, ubiquinone. D'après Tielens et al., 2002.

de dismutation du malate ». En effet, afin de maintenir la balance d'oxydoréduction de la mitochondrie, une partie du malate provenant du cytoplasme, est oxydée en acétyl-CoA par l'action de l'enzyme malique et du complexe PDH (Figure 23). L'étape suivante consiste au transfert du résidu Coenzyme A vers le succinate, réaction catalysée par l'Acétate:Succinate-CoA Transférase (ASCT), l'acétate étant le produit final de la réaction. Le succinyl-CoA sert ensuite de substrat à la Succinyl-CoA Synthase (SCS), également connue sous le nom de Succinate:Thiokinase (STK), conduisant à la production d'une molécule d'ATP par un phénomène de phosphorylation au niveau du substrat (Figure 23).

Une autre partie du malate est réduite en fumarate, qui sera ensuite réduit en succinate. La réduction du malate en fumarate d'une part, et la réduction du fumarate en succinate d'autre part, sont des réactions inverses du cycle de Krebs. Chez la mitochondrie aérobie, le succinate est en effet oxydé en fumarate, grâce à l'activité succinate déshydrogénase (SDH) du complexe II de la chaîne respiratoire, les électrons étant ensuite transférés au complexe III grâce à l'ubiquinone. Dans le cas de la mitochondrie anaérobie, le complexe II semble fonctionner en sens inverse, et présente dans ce cas une activité fumarate réductase (FRD) (Figure 23). La chaîne de transporteurs d'électrons est ainsi très différente de celle rencontrée en aérobiose, et se résume aux complexes I et II. Le complexe I fournit ainsi les électrons (provenant de l'oxydation du NADH) au complexe II, nécessaires à la réduction du fumarate en succinate. Le transit des électrons entre les deux complexes est réalisé, non pas par une ubiquinone, mais par une rhodoquinone, comportant un potentiel d'oxydoréduction relativement faible, compatible avec la réaction de réduction du fumarate. Cette chaîne respiratoire particulière est également connue sous le nom de système NADH-fumarate réductase. Celle-ci, par l'activité de pompe à proton du complexe I, permet la création d'un gradient électrochimique, conduisant à la production d'ATP par l'ATP synthase.



### B.3.2 Succinate déshydrogénase versus fumarate réductase

Les activités d'oxydation du succinate et de réduction du fumarate sont assurées chez les procaryotes par deux complexes enzymatiques distincts : une succinate:ubiquinone oxydoréductase (qui est en fait le complexe II), et une ménaquinol:fumarate oxydoréductase (FRD). Il est à noter que de manière identique aux mitochondries, la nature de la quinone responsable du transit des électrons dans la chaîne de transporteur d'électrons est différente selon les conditions d'oxygénation du milieu. Les électrons sont transportés par une ubiquinone en conditions aérobies, et par une ménaquinone en conditions anaérobies. Des études chez *Escherichia coli* montrent que le changement entre le métabolisme aérobie et anaérobie de cette bactérie est accompagné d'une expression différentielle des gènes codant ces deux enzymes (Lancaster, 2002). Le complexe II est exprimé pour l'oxydation du succinate en conditions aérobies, alors que la FRD est exprimée pour la réduction du fumarate en anaérobiose.

Chez les eucaryotes, dans la mitochondrie, les complexes FRD et SDH sont composés de 4 sous-unités différentes. Le site catalytique, responsable de la prise en charge du succinate et du fumarate, est composé de deux sous-unités : une flavoprotéine, appelée sous-unité Fp, et une sous-unité à centres Fe/S, connue sous le nom de sous-unité Ip. L'ancrage du complexe dans la membrane interne mitochondriale est lié à la présence de deux autres sous-unités hydrophobes (CybS et CybL), contenant chacune un cytochrome de type *b*. Les sous-unités CybS et CybL permettent également l'interaction avec la quinone, afin de transférer les électrons aux sous-unités catalytiques. Des analyses phylogénétiques réalisées à partir des séquences protéiques des sous-unités Fp et Ip, révèlent que le complexe FRD eucaryote est beaucoup plus proche du complexe II mitochondrial, que du complexe FRD procaryote (Tielens *et al.*, 2002). Contrairement aux procaryotes, pour lesquels les complexes FRD et SDH sont différents, le complexe II mitochondrial comporte ainsi une « double compétence » métabolique, présentant une activité SDH en aérobie, et une activité FRD en anaérobiose. D'un point de vue évolutif, ceci indique que l'adaptation de la mitochondrie à des environnements pauvres en dioxygène a conduit à une restructuration



du complexe II « traditionnel », lui permettant d'acquérir les électrons provenant d'une quinone à bas potentiel d'oxydoréduction (rhodoquinone), nécessaires à la réduction de l'accepteur final d'électrons et à la production d'énergie.

Ces données soulèvent tout de même une question importante : si les activités FRD et SDH peuvent être assurées par le même complexe, quels sont les éléments régulateurs permettant d'orienter le complexe II vers l'une ou l'autre de ces activités ? Une étude récente, basée sur le métabolisme mitochondrial de cellules cancéreuses humaines, a montré que l'activité FRD ou SDH du complexe II était dépendante de l'état de phosphorylation de la sous-unité catalytique Fp. Les mitochondries des cellules tumorales, qui évoluent dans un microenvironnement anaérobie du fait de l'hypo-vascularisation des masses tumorales, présentent effectivement une activité FRD, témoignant de l'existence d'un système NADH-fumarate réductase. Les auteurs montrent également que l'activité FRD du complexe II est augmentée lorsque la sous-unité Fp est phosphorylée, une déphosphorylation de cette même sous-unité conduisant à une augmentation de l'activité SDH (Tomitsuka *et al.*, 2010). Ce mode de régulation post-traductionnel par phosphorylation/déphosphorylation a également été montré pour les complexes I et IV de la chaîne respiratoire, leur activité étant modulée par l'état de phosphorylation de certaines sous-unités (Lee *et al.*, 2002; Papa *et al.*, 2002).

La mitochondrie demeure donc un organe faisant preuve d'une extraordinaire plasticité métabolique, permettant l'adaptation de nombreux organismes aux environnements pauvres en dioxygène. De manière générale, la dégradation anaérobie d'une molécule de glucose, dont les produits finaux sont l'acétate (produit par phosphorylation au niveau du substrat), et le succinate (par respiration du fumarate), fournit en moyenne 5 molécules d'ATP (Tielens *et al.*, 2002), ce qui est tout de même bien inférieur à la production énergétique d'une mitochondrie aérobie, mais suffisant à la survie de la cellule ou du parasite en conditions anoxiques. En comparaison avec une mitochondrie aérobie typique, la mitochondrie anaérobie comporte ainsi 3 différences majeures : (1) l'activité FRD du complexe II, (2) la nature de la quinone (rhodoquinone) responsable du





transit des électrons dans la chaîne de transporteurs, et (3) l'activité de l'ASCT, responsable de la conversion de l'acétyl-CoA en acétate.

La mitochondrie de la forme trypanomastigote procyclique de *T. brucei* excrète également du succinate et de l'acétate, produits finaux caractéristiques de la mitochondrie anaérobie. L'acétate est formé par l'intermédiaire de la même voie métabolique se déroulant au sein de la mitochondrie anaérobie. Celle-ci fait effectivement intervenir l'activité enzymatique de l'ASCT, permettant à la SCS de produire de l'ATP par phosphorylation au niveau du substrat. Néanmoins, à la différence de la mitochondrie anaérobie, le succinate ne résulte pas de l'activité FRD du complexe II, mais provient de l'activité d'une fumarate réductase soluble dépendante du NADH (FRDm1) se trouvant dans la matrice de la mitochondrie (Coustou *et al.*, 2005). La réduction du fumarate en succinate n'est donc pas liée à la présence d'un système NADH-fumarate réductase, retrouvé dans la mitochondrie anaérobie. La chaîne respiratoire de la mitochondrie de *T. brucei* comporte d'ailleurs l'ensemble des complexes retrouvés chez une mitochondrie aérobie classique, dont le fonctionnement, nous l'avons vu, est dépendant de la nature de la source de carbone présente dans le milieu (voir Figure 21). Il apparaît donc que la mitochondrie de *T. brucei*, évoluant pourtant en aérobiose, comporte des traits métaboliques particuliers, soutenant le fait que la mitochondrie est un organite capable de faire preuve d'une extraordinaire diversité morphologique et métabolique.

Cette plasticité apporte également une capacité d'adaptation des organismes à leur environnement, tant sur le plan de l'utilisation de la source de carbone disponible, que sur la limitation de la quantité de dioxygène présente. Ainsi, l'image de la mitochondrie aérobie traditionnelle est bien loin de révéler que celle-ci est également capable de produire de l'énergie en absence d'O<sub>2</sub> chez certains organismes anaérobies facultatifs, tels que les helminthes parasites. Néanmoins d'autres organismes, anaérobies ou microaérophiles pour la plupart, comportent des organites aux propriétés particulières, certains ayant conservé la capacité de produire de l'énergie sous forme d'ATP. Ces organites, métaboliquement différents des mitochondries, semblent néanmoins tous dériver d'une mitochondrie



ancestrale. Ces descendants mitochondriaux sont connus sous le nom d'hydrogénosome, de mitosomes, ou de Mitochondrion-Like Organelles (MLOs).

## **C. Hydrogénosomes et mitosomes : des organites apparentés aux mitochondries**

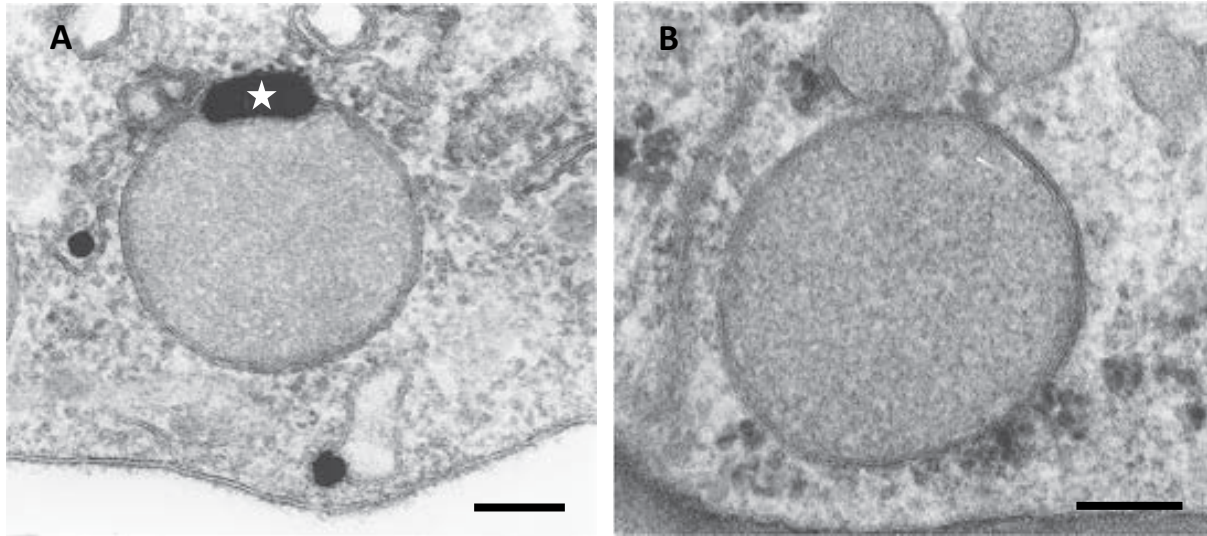
### **C.1 Les hydrogénosomes, des organites producteurs d'hydrogène**

Les hydrogénosomes sont définis comme des organites qui, sous des conditions anoxiques, sont capables de réaliser la décarboxylation oxydative du malate ou du pyruvate en acétate, en CO<sub>2</sub> et en hydrogène moléculaire H<sub>2</sub>. Ceci va s'accompagner d'une production d'énergie sous forme d'ATP (Muller, 1993). Contrairement aux mitochondries, les hydrogénosomes ne contiennent ni cytochrome, ni cycle de Krebs, et ne contiennent pas non plus de chaîne de phosphorylation oxydative. Néanmoins, la plupart des enzymes présentes dans les hydrogénosomes sont également retrouvées dans les mitochondries. Il existe cependant deux enzymes spécifiques à ces organites : la Pyruvate:Ferrédoxine Oxydo-Réductase (PFOR), et l'hydrogénase à fer ([Fe]-hydrogénase) (Embley *et al.*, 2003). Les hydrogénosomes sont retrouvés chez une grande variété d'eucaryotes mais sont absents chez des organismes contenant des mitochondries, suggérant que ces deux organites sont mutuellement exclusifs.

Nous verrons dans ce chapitre qu'il existe une grande variété d'hydrogénosomes, à la fois sur le plan structural et biochimique.

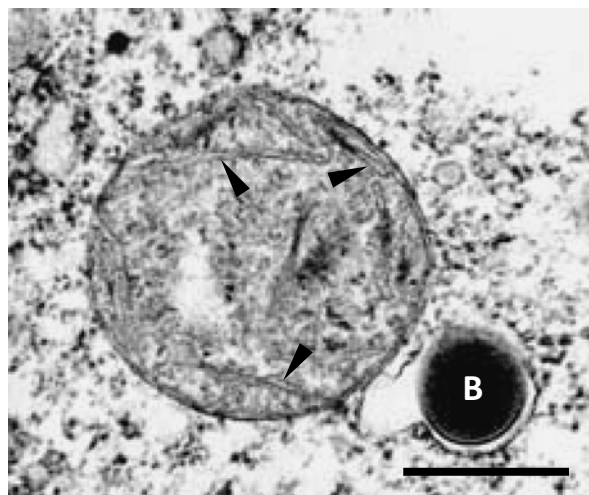
#### ***C.1.1 Morphologies***

Les hydrogénosomes sont des organites de forme ovoïde, d'environ 1 µm de diamètre, présents en grand nombre dans la cellule. Chez *Tritrichomonas foetus*, flagellé parasite du tractus reproducteur des bovins et du tractus intestinal du chat, et pour lequel



**Figure 24. Observations d'hydrogénosomes en microscopie électronique à transmission.**

(A) Hydrogénosome du flagellé parasite anaérobie *Tritrichomonas foetus*. La présence d'une vésicule aplatie dense aux électrons (étoile), correspondrait à une accumulation de calcium. (B) Hydrogénosome du champignon anaérobie *Neocallimastix patriciarum*. Echelle : 200 nm. D'après Van der Giezen et Tovar, 2005.



**Figure 25. Observations en MET d'un hydrogénosome du Cilié parasite anaérobie *Nyctotherus ovalis*.** Noter l'existence inhabituelle de crêtes (pointes de flèches), au sein de la matrice de l'hydrogénosome. Des archaeobactéries méthanogènes endosymbiotiques (B) sont fréquemment observées à proximité des hydrogénosomes de *N. ovalis*. Echelle : 500 nm. D'après Boxma et al., 2005.

les descriptions morphologiques sont les plus nombreuses, les hydrogénosomes représentent environ 4% du volume total de la cellule (Benchimol *et al.*, 1996). Comme les mitochondries, les hydrogénosomes sont sans exception, délimités par deux membranes très fortement accolées (Figure 24). Dans la plupart des cas, aucun espace intermembranaire n'est observé entre les deux membranes. La présence d'une vésicule aplatie, très dense aux électrons en MET, est souvent observée à la périphérie de l'organite (Figure 24B) (Benchimol *et al.*, 1996). Cette vésicule serait impliquée dans l'accumulation des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , fonction également présente chez la mitochondrie (Benchimol *et al.*, 1982; De Souza and Benchimol, 1988). Les crêtes, éléments morphologiques caractéristiques des mitochondries, sont généralement absentes au sein de la matrice des hydrogénosomes. Les eucaryotes possédant des hydrogénosomes sont en effet des organismes anaérobies, qui par conséquent, n'utilisent pas l' $\text{O}_2$  comme accepteur final d'électrons. L'augmentation de la surface de la membrane interne de la mitochondrie, qui a pour rôle d'augmenter la capacité et l'efficacité de la chaîne respiratoire, n'est donc pas nécessaire au niveau des membranes hydrogénosomales. Cette hypothèse est confortée par l'observation des mitochondries de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui sous conditions anoxiques, perdent leurs crêtes et prennent alors une morphologie de type hydrogénosomal (Loyd, 1974). Cependant, il a récemment été montré l'existence de crêtes au sein des hydrogénosomes du Cilié *Nyctotherus ovalis*, parasite anaérobie de l'intestin postérieur des cafards (Figure 25) (Boxma *et al.*, 2005).

### C.1.2 Origine et description

Les hydrogénosomes ont été découverts dans les années 1970 chez *Tritrichomonas foetus*, (Cerkasovova *et al.*, 1973; Lindmark and Muller, 1973) et chez le parasite humain *Trichomonas vaginalis* (Lindmark *et al.*, 1975). Ces organites ont ensuite été décrits chez plusieurs ciliés anaérobies comme *Nyctotherus ovalis* (Berger and Lynn, 1992; Boxma *et al.*, 2005; Paul *et al.*, 1990) et chez certains champignons anaérobies tels que le chytride *Neocallimastix* sp. (Yarlett *et al.*, 1986). Il est intéressant de noter que ces différents



organismes ont une distribution phylogénétique relativement éloignée, seules leurs conditions environnementales de survie, liées à l'absence d'oxygène, sont similaires.

#### C.1.2.1 L'hydrogénosome du Parabasalide *Trichomonas vaginalis*

Les hydrogénosomes chez les Parabasalia, et notamment chez les trichomonadines, ont été beaucoup étudiés depuis ces trente dernières années (Lindmark and Muller, 1973; Muller, 1993). Peu de temps après leur découverte, il a été suggéré que les hydrogénosomes provenaient d'une endosymbiose réalisée entre un proto-eucaryote primitif, et une eubactérie anaérobie du genre *Clostridium*, bactérie capable de produire de l'hydrogène moléculaire H<sub>2</sub>, en utilisant comme enzymes une PFOR et une hydrogénase à fer (Whatley *et al.*, 1979). De plus, la mise en évidence d'une double membrane délimitant les hydrogénosomes de *T. foetus* a conforté l'hypothèse d'une origine endosymbiotique mais n'a pas permis de conclure sur l'origine exacte de cette endosymbiose (Benchimol and De Souza, 1983). En effet, malgré la présence d'une double membrane, ces organites étaient considérés morphologiquement et biochimiquement distincts des mitochondries (Benchimol *et al.*, 1996).

Cependant, les études moléculaires et biochimiques ont véritablement changé cette vision. Tout d'abord, l'identification de gènes chez *T. vaginalis* codant pour des protéines chaperonnes de type mitochondrial (Hsp70 et Hsp60) suggère que les hydrogénosomes partagent un ancêtre commun avec la mitochondrie (Bui *et al.*, 1996; Germot *et al.*, 1996; Horner *et al.*, 1996; Roger *et al.*, 1996). De plus, la localisation d'une de ces protéines (Hsp60) au niveau des hydrogénosomes (Bozner, 1997; Bui *et al.*, 1996), la présence de la protéine membranaire hydrogénosomale (Hmp31) de la famille des transporteurs ADP/ATP mitochondriaux (Dyall *et al.*, 2000), et de l'enzyme acétate:succinate coenzyme A synthétase retrouvée aussi chez les mitochondries (Tielens *et al.*, 2002), fournissent des preuves supplémentaires à l'hypothèse de l'origine mitochondriale. Plus récemment, deux protéines de 24 et 51 kDa correspondant à des sous-unités du complexe I de la chaîne respiratoire ont été identifiées (Dyall *et al.*, 2004; Hrdy *et al.*, 2004). Ces protéines seraient d'origine





mitochondriale et participeraient au métabolisme hydrogénosomal pour la production d'hydrogène moléculaire.

Malgré ces ressemblances, les hydrogénosomes de *T. vaginalis* présentent des différences importantes par rapport aux mitochondries : absence de génome, de ribosomes, de cytochromes, de chaînes de transport d'électrons, de cardiolipine et de crêtes formées par la membrane interne (Benchimol *et al.*, 1996; Voncken *et al.*, 2002). De plus, les hydrogénosomes de *T. vaginalis* possèdent deux enzymes caractéristiques de ces organites, sensibles à l'oxygène, et retrouvées également chez des bactéries anaérobies : l'hydrogénase à fer et la PFOR. Notons que les enzymes hydrogénosomales de *T. vaginalis* ne possèdent pas de pré-séquences d'adressage mitochondrial, retrouvées à l'extrémité N-terminale des protéines destinées à être importées à la mitochondrie. En revanche, elles possèdent à l'extrémité N-terminale, une extension très courte de 8 à 13 acides aminés, dont la séquence semble être conservée (Alderete *et al.*, 1995; Lahti *et al.*, 1994).

#### C.1.2.2 L'hydrogénosome du Chytridiomycète *Neocallimastix* sp.

Les chytrides anaérobies sont des champignons symbiontes importants retrouvés dans le tractus gastro-intestinal de nombreux mammifères. Il a été montré que ces organismes se sont adaptés secondairement à un système de vie anaérobie (Voncken *et al.*, 2002; Yarlett, 1994).

Les hydrogénosomes de ces champignons ont été mis en évidence en 1986, chez le genre *Neocallimastix* (Yarlett *et al.*, 1986). L'observation en MET d'une simple membrane laissait supposer que ces hydrogénosomes pourraient être des peroxysomes modifiés (Cavalier-Smith, 1987). Deux autres études ont ensuite permis de montrer que les hydrogénosomes de *Neocallimastix* sp. étaient en fait délimités par une double membrane (Benchimol *et al.*, 1997; van der Giezen *et al.*, 1997), ressemblant fortement à celle des hydrogénosomes de *T. vaginalis*. Il est également important de noter que les hydrogénosomes de *Neocallimastix*, tout comme ceux de *T. vaginalis*, ne possèdent pas de



génomique (van der Giezen *et al.*, 1997). Néanmoins, les protéines hydrogénomales de ces champignons comportent une pré-séquence d'adressage classiquement retrouvée à l'extrémité N-terminale des protéines destinées à être importées à la mitochondrie. Des expériences de génétique fonctionnelle montrent en effet que ces pré-séquences sont capables de cibler les protéines à la mitochondrie d'un organisme hétérologue. Ainsi, l'enzyme malique hydrogénomale de *N. frontalis* est capable d'être adressée à la mitochondrie de la levure *Hansenula polymorpha* (van der Giezen *et al.*, 1998). Enfin, les hydrogénomosomes des champignons possèdent des transporteurs ADP/ATP d'origine mitochondriale, permettant l'échange d'ATP avec le cytoplasme (van der Giezen *et al.*, 2002; Voncken *et al.*, 2002), des protéines chaperonnes de type mitochondrial (van der Giezen *et al.*, 2003), mais aussi une Succinyl-Coenzyme A synthétase (SCS) confirmant également l'affiliation avec la mitochondrie (Dacks *et al.*, 2006).

#### C.1.2.3 L'hydrogénomosome particulier du Cilié *Nyctotherus ovalis*

Chez le cilié anaérobie *Nyctotherus ovalis*, parasite de l'intestin postérieur des cafards, les hydrogénomosomes à double membrane ont une morphologie et une composition particulières. En effet, la membrane interne forme des crêtes ressemblant à celles des mitochondries, et des ribosomes ont été observés. De plus, il a récemment été montré la présence d'un génome dans la matrice de ces organites (Akhmanova *et al.*, 1998; Boxma *et al.*, 2005; de Graaf *et al.*, 2011). L'amplification quasi-totale de ce génome de 46,7 kpb montre que celui-ci, en codant pour des ARN et des protéines ribosomales, et certaines sous-unités du complexe I, comporte un contenu génique similaire aux génomes mitochondriaux retrouvés chez les ciliés aérobies comme *Euplotes minuta*. Néanmoins, il est important de noter que ce génome, à la différence de ses homologues mitochondriaux, ne comporte aucun gène codant pour les complexes III, IV et pour l'ATP synthase (Figure 26) (de Graaf *et al.*, 2011). L'analyse phylogénétique des gènes codant pour certaines protéines du complexe I révèle que celles-ci sont homologues aux protéines du complexe I retrouvées chez des ciliés vivant en conditions aérobies (Hackstein *et al.*, 2001; van Hoek *et al.*, 2000).

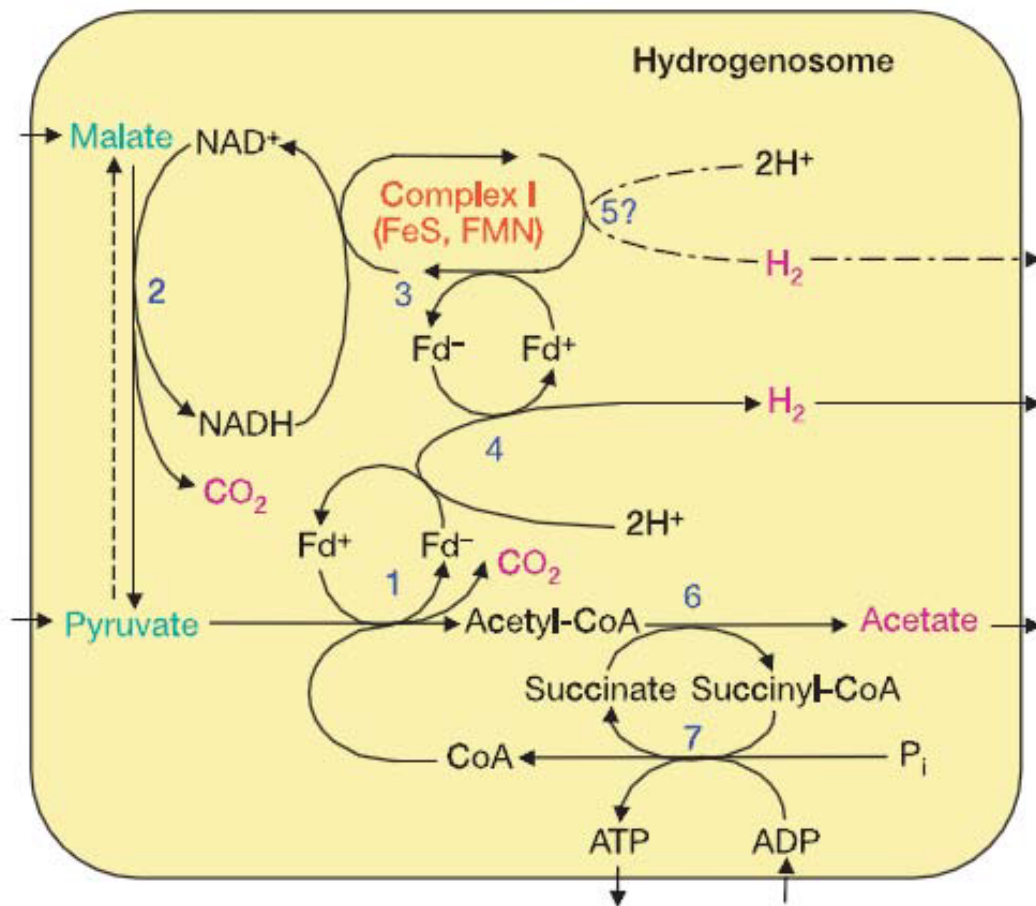


Les données de séquences montrent également que le génome nucléaire code pour certaines protéines typiquement mitochondriales, comme la PDH ou certaines sous-unités du complexe II. L'hydrogénosome de *N. ovalis*, qui est par définition capable de produire de l'hydrogène (Lindmark and Muller, 1973), est donc une mitochondrie modifiée. L'absence de gène codant pour les complexes III, IV et pour l'ATP synthétase dans le génome de cet organelle, témoigne d'une importante adaptation de cette mitochondrie productrice d'hydrogène aux conditions anoxiques.

### C.1.3 Distinctions métaboliques

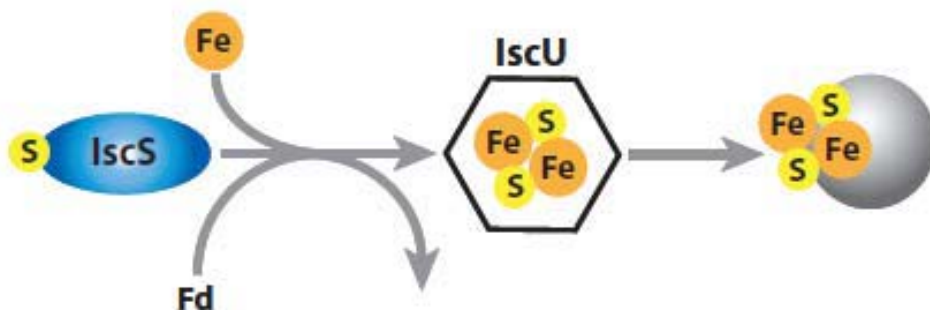
La fonction majeure de la mitochondrie est de convertir le pyruvate provenant de la glycolyse en acétyl-CoA, afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP, en faisant intervenir le cycle de Krebs et la glycolyse. On estime, suivant l'état métabolique de la mitochondrie, que 10 à 15 molécules d'ATP sont produites lors de l'oxydation complète d'une molécule de pyruvate. La fonction principale de l'hydrogénosome est également la production d'ATP par la décarboxylation oxydative du pyruvate, mais celle-ci est beaucoup moins efficace comparée à celle produite par la mitochondrie (une molécule d'ATP produite par molécule de pyruvate). La décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA dans la mitochondrie est réalisée grâce au complexe PDH, alors que l'hydrogénosome utilise une PFOR, enzyme typique du métabolisme hydrogénosomal. Nous nous attacherons dans un premier temps, à décrire le métabolisme de l'hydrogénosome de *T. vaginalis*, celui-ci étant le plus largement étudié par rapport à d'autres organismes.

Le pyruvate, formé lors de la glycolyse, entre dans l'hydrogénosome et subit une décarboxylation par l'activité de la PFOR, fournissant de l'acétyl-CoA. Cette décarboxylation est également liée à un transport d'électrons, réalisé grâce à une ferrédoxine, et entraîne la production de molécules d'hydrogène par l'action d'une hydrogénase à fer. L'étape suivante consiste au transfert du résidu Coenzyme A vers le succinate, réaction catalysée par l'acétate:succinate CoA transférase (ASCT), l'acétate étant le produit final de la réaction. Le



**Figure 27. Métabolisme de l'hydrogénosome de *Trichomonas vaginalis*.**

(1) Pyruvate:Ferrédoxine Oxydoréductase (PFOR); (2) NAD enzyme malique; (3) NADH:Ferrédoxine oxydoreductase (51 kDa (Tvh-47) et 24 kDa (Tvh-22)); (4) [Fe]-hydrogénase; (5) [Fe]-hydrogénase dépendante de NAD; (6) Acétate:Succinate-CoA Transférase (ASCT); (7) Succinyl-CoA Synthase (SCS). D'après Hrdy et al., 2004.



**Figure 28. Formation et assemblage des centres Fe/S dans les mitochondries.**

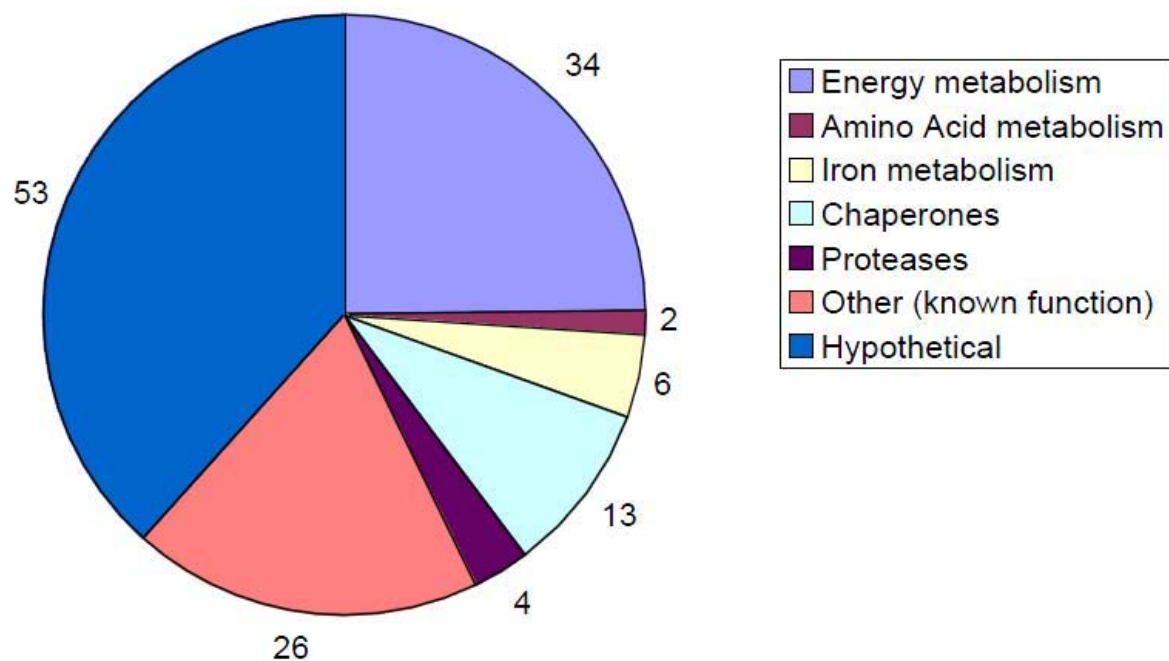
IscS est une cystéine désulfurase et permet la fourniture d'ions soufre (S). Les ions de fer (Fe) sont fournis par une frataxine. La ferrédoxine (Fd) est un cofacteur conduisant à la réduction des atomes de soufre. La protéine IscU, dans laquelle se forme le centre Fe/S, réalise le transfert de celui-ci à l'apoprotéine. D'après Shiflett et Johnson, 2011.

succinyl-CoA sert ensuite de substrat à la SCS (aussi appelée succinate thiokinase, STK), qui va conduire à la production d'une molécule d'ATP. Le malate peut également être une source intermédiaire à ce métabolisme, en étant décarboxylé en pyruvate par une enzyme malique dépendante du NAD. La réoxydation du NADH est réalisée par l'activité NADH:ferrédoxine oxydoréductase vraisemblablement apportée par l'existence d'un complexe I, lié à la ferrédoxine (Figure 27) (Hrdy *et al.*, 2004).

La seconde différence majeure entre l'hydrogénosome et la mitochondrie se situe au niveau de la nature de l'accepteur final d'électrons. L'accepteur final utilisé par la mitochondrie dite « classique » est l'oxygène moléculaire, alors que l'hydrogénosome utilise des protons. Le couplage des électrons (apportés par la ferrédoxine) avec les ions hydrogène est effectué par l'activité enzymatique de l'hydrogénase à fer, amenant à une production d'H<sub>2</sub>. De plus, une autre hydrogénase à fer de 65 kDa, dépendante du NAD, serait capable d'interagir avec le complexe I, conduisant à une deuxième source d'hydrogène moléculaire (Figure 27) (Hrdy *et al.*, 2004).

Plusieurs autres fonctions des hydrogénosomes de *T. vaginalis* ont été décrites, notamment leur rôle de réservoirs à calcium sous la forme Ca<sup>2+</sup> (Benchimol *et al.*, 1996; Humphreys *et al.*, 1994). Les études sur le fonctionnement du métabolisme des hydrogénosomes ont montré l'existence de deux gènes codant des cystéine désulfurases de type mitochondrial (IscS) chez *T. vaginalis* (Tachezy *et al.*, 2001). Les protéines IscS jouent un rôle central dans la biosynthèse des centres Fe/S, une fonction essentielle de la mitochondrie (Figure 28) (Lill *et al.*, 1999; Lill and Kispal, 2000). Ces protéines étant de plus retrouvées dans l'hydrogénosome de *T. vaginalis*, il est donc fortement suggéré qu'un autre rôle des hydrogénosomes est de permettre la biosynthèse des centres Fe/S (Sutak *et al.*, 2004). L'analyse récente du génome de *T. vaginalis* montre que les protéines impliquées dans la formation des centres Fe/S possèdent en effet les signaux d'adressage à l'hydrogénosome, et que la machinerie complète permettant la formation de ces centres est présente dans l'organite (Carlton *et al.*, 2007).





**Figure 29. Représentation graphique des 138 protéines potentiellement adressées à l'hydrogénosome de *Trichomonas vaginalis*.** Chacun des chiffres représente le nombre de protéines classées dans chacune des fonctions. D'après Carlton et al., 2007.

Les hydrogénosomes interviennent également dans le métabolisme des acides aminés. Il a en effet été identifié deux composants du complexe de clivage de la glycine (GCV), la protéine L et la protéine H, ainsi que la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) qui, chez les eucaryotes, existe sous une isoforme cytosolique et une isoforme mitochondriale (Mukherjee *et al.*, 2006a; Mukherjee *et al.*, 2006b). Chez *T. vaginalis*, un seul gène codant l'isoforme mitochondriale est présent, et code pour une protéine présentant une séquence putative d'adressage aux hydrogénosomes (Carlton *et al.*, 2007).

L'analyse complète du génome de *T. vaginalis* a mis en évidence 138 protéines présentant des pré-séquences d'import hydrogénosomal. Parmi ces protéines, seules 34 sont impliquées dans le métabolisme énergétique, six interviennent dans le métabolisme du fer, et deux sont impliquées dans le métabolisme des acides aminés (Figure 29).

Le métabolisme hydrogénosomal chez les ciliés et les champignons a été beaucoup moins étudié. Cependant, les données montrent des différences significatives avec le métabolisme de l'hydrogénosome de *T. vaginalis*. Une des différences majeures entre l'hydrogénosome des trichomonadines et des chytrides concerne le catabolisme du pyruvate. Alors que l'organite de *T. vaginalis* utilise la PFOR pour la décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA, l'activité enzymatique impliquée dans le métabolisme de l'hydrogénosome de *Neocallimastix* est exercée par une Pyruvate:Formate Lyase (PFL), formant ainsi de l'acétyl-CoA et du formate (Akhmanova *et al.*, 1999; Boxma *et al.*, 2004). De la même manière que dans l'hydrogénosome de *T. vaginalis*, l'acétyl-CoA est ensuite pris en charge par l'ASCT, qui en fournissant du succinyl-CoA à la SCS, va conduire à la production d'énergie sous forme d'ATP. Les produits finaux de ce type de métabolisme seront donc de l'hydrogène moléculaire, du formate et de l'acétate.

Enfin, l'hydrogénosome de *N. ovalis* ne possède également pas de PFOR, mais un complexe PDH, responsable de la décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA dans la mitochondrie. Il est à noter que le produit majoritaire final produit par les hydrogénosomes de *N. ovalis* est le succinate, à la différence des hydrogénosomes dit « classiques », qui



produisent majoritairement de l'acétate (Boxma *et al.*, 2005). Les récentes données génomiques de *N. ovalis* révèlent que cet hydrogénosome particulier comporte une chaîne respiratoire incomplète, constituée des complexes I et II, utilisant le fumarate comme accepteur final d'électrons. Des protéines intervenant dans des voies biochimiques mitochondriales ont également été identifiées, comme le métabolisme des acides aminés, la défense contre le stress oxydant, la synthèse de protéines mitochondriales, ou encore la machinerie d'import mitochondrial (de Graaf *et al.*, 2011). Ceci montre une parenté des hydrogénosomes de *N. ovalis* avec les mitochondries anaérobies retrouvées chez certains helminthes parasites (*Fasciola hepatica*, *Ascaris suum*). L'observation de ces caractéristiques mitochondriales, combinée à la production d'hydrogène moléculaire, peut nous conduire à penser que cet organe constitue un intermédiaire entre la mitochondrie et l'hydrogénosome.

#### C.1.4 Particularité des protéines hydrogénomales de *Trichomonas vaginalis*

Le parasite flagellé *T. vaginalis* est l'agent de la trichomonose, une des maladies communes non virales transmissibles à l'homme. L'adhésion du parasite aux cellules épithéliales vaginales est essentielle pour l'initiation et le maintien de l'infection par le parasite. Cette cytoadhérence est liée à des interactions de type récepteurs-ligands (Alderete and Garza, 1985, , 1988), dans lesquelles interviennent des protéines de surface nommées AP65, AP51, AP33, AP23 (AP signifiant « adhesion protein ») (Alderete *et al.*, 1995; Arroyo *et al.*, 1992).

Il a été montré que trois de ces protéines (AP65, AP51, AP33), appartenant à des familles multigéniques, pourraient en réalité être des enzymes hydrogénomales (Kulda, 1999; Muller, 1993). La protéine AP65 est en effet l'enzyme malique hydrogénomale, et les protéines AP33 et AP51 correspondent respectivement aux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de l'enzyme SCS. La transcription des gènes codant ces protéines est régulée positivement par le fer (Alderete *et al.*, 1995; Alderete *et al.*, 2001; Engbring *et al.*, 1996; Engbring and



Alderete, 1998), excepté pour la protéine AP51 (Alderete *et al.*, 1998). Dans des conditions normales, ces protéines sont localisées dans les hydrogénosomes. Lorsque la concentration en fer de la cellule augmente, ou que le parasite est en contact avec la cellule-hôte, les protéines seraient relocalisées au niveau de la membrane plasmique de *T. vaginalis*. Elles jouent alors le rôle de protéines d'adhésion (Alderete *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2003). Des expériences d'extinction du gène codant pour la protéine AP65 montrent en effet une réduction du taux d'adhésion des parasites aux cellules épithéliales vaginales (Mundodi *et al.*, 2004). De plus, l'expression hétérologue d'AP65 de *T. vaginalis* chez *Trichomonas foetus* montre que cette protéine hétérologue est fonctionnelle et qu'elle est localisée dans les hydrogénosomes ainsi qu'à la surface du parasite (Kucknoor *et al.*, 2005). Enfin, il a été observé que ces parasites exprimant la protéine hétérologue Tv-AP65 étaient également capables d'adhérer aux cellules humaines VECs (Vaginal Epithelial Cells), alors que ces cellules ne sont pas les hôtes naturels de *T. foetus*.

La PFOR a également été identifiée comme étant une protéine possédant cette dualité fonctionnelle. Cette enzyme, nommée AP120, est en effet relocalisée à la surface du parasite lorsque la concentration en fer de la cellule parasitaire augmente. Il est intéressant de noter qu'une protéine de 130 kDa a été détectée à la surface de cellules HeLa comme étant un récepteur potentiel de la protéine AP120 (Moreno-Brito *et al.*, 2005).

*T. vaginalis* fait partie des pathogènes qui possèdent des enzymes métaboliques associées à la surface, les SAEs (Surface-Associated Metabolic Enzymes) (Alderete *et al.*, 2001). Ces protéines ont été nommées « moonlighting » car elles peuvent changer de fonction suite à une modification de leur localisation cellulaire, une expression dans un nouveau type cellulaire, mais aussi en raison d'une certaine concentration cellulaire en ligands, en substrats ou en cofacteurs. L'exemple clef de la diversité fonctionnelle des enzymes métaboliques qui présentent des fonctions alternatives est la Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Alderete *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2004; Pancholi and Fischetti, 1993), également retrouvée à la surface de la membrane de *T. vaginalis*, suggérant un rôle d'adhésion (Lama *et al.*, 2009). La GAPDH intervient dans la voie de la glycolyse mais



possède aussi d'autres fonctions, liées au métabolisme classique de la cellule (endocytose, réparation de l'ADN, régulation de la transcription/traduction), mais aussi dans certaines pathologies.

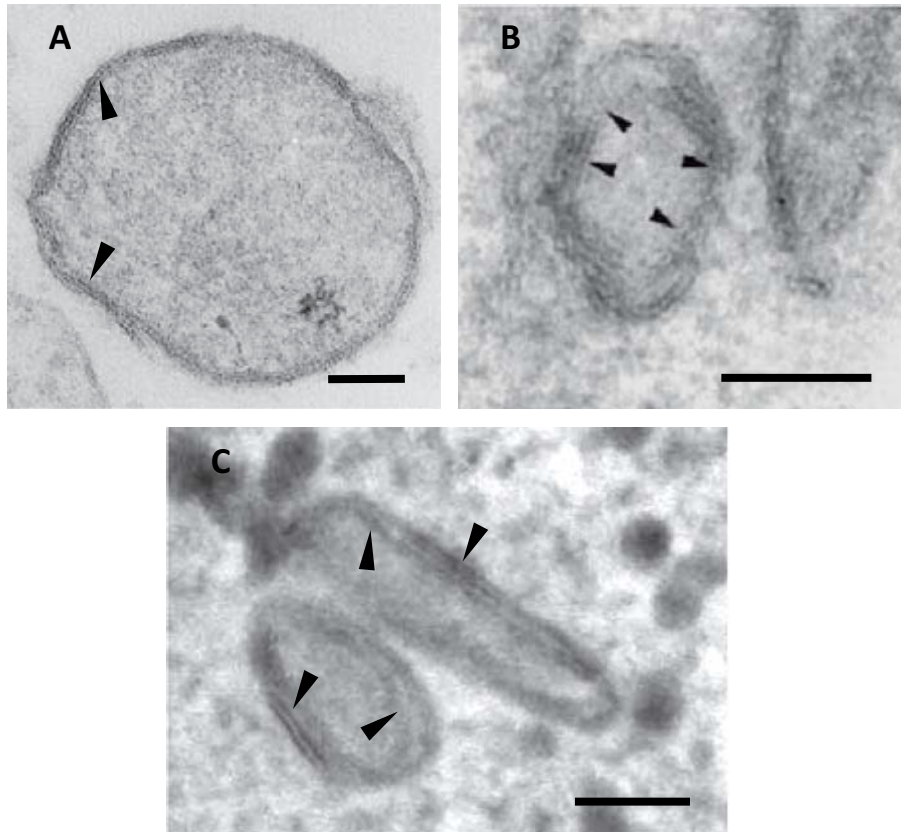
Ainsi, chez *T. vaginalis*, le fer est un des facteurs essentiels au déclenchement du changement de fonctions de ces protéines, et à la modulation de leur localisation à l'extérieur des hydrogénosomes (Garcia *et al.*, 2003).

## C.2 Les mitosomes

Certaines études ont mis en évidence la présence d'organites particuliers, dont l'origine semble être mitochondriale, comme les hydrogénosomes, mais qui ne présentent pas d'hydrogénase (Mai *et al.*, 1999; Riordan *et al.*, 2003; Tovar *et al.*, 1999; Williams and Keeling, 2003).

La découverte de ces organites peut être illustré par la localisation d'une protéine chaperonne mitochondriale (Hsp60) dans de petits organites à double-membrane inconnus jusqu'alors chez l'amibe *Entamoeba histolytica*. Deux noms différents ont été proposés pour nommer ces organites dérivés des mitochondries : « mitosome », pour indiquer leur lien avec la mitochondrie (Tovar *et al.*, 1999), et « crypton » pour rappeler leur nature cachée et leur fonction inconnue (Mai *et al.*, 1999), le nom de mitosome étant actuellement la dénomination la plus utilisée par la communauté scientifique. Les mitosomes ont également été découverts chez l'apicomplexe *Cryptosporidium parvum* par la localisation de la chaperonne mitochondriale Hsp60 (Riordan *et al.*, 2003), chez les microsporidies comme *Trachipleistophora hominis*, par la localisation de la chaperonne mitochondriale Hsp70 (Williams *et al.*, 2002), et également chez le diplomonadine *Giardia intestinalis*, par la localisation de protéines connues pour intervenir dans le métabolisme mitochondrial de la synthèse des protéines à centre Fe/S (Tovar *et al.*, 2003).





**Figure 30.** Observations en MET des mitosomes du parasite intestinal *Entamoeba histolytica* (A), de la microsporidie *Trachipleistophora hominis* (B), et de la diplomonadine *Giardia intestinalis* (C). Noter la présence d'une double membrane délimitant ces organites (pointes de flèche). Echelle : 100 nm (A); 50 nm (B, C). D'après van der Giezen et Tovar, 2005.

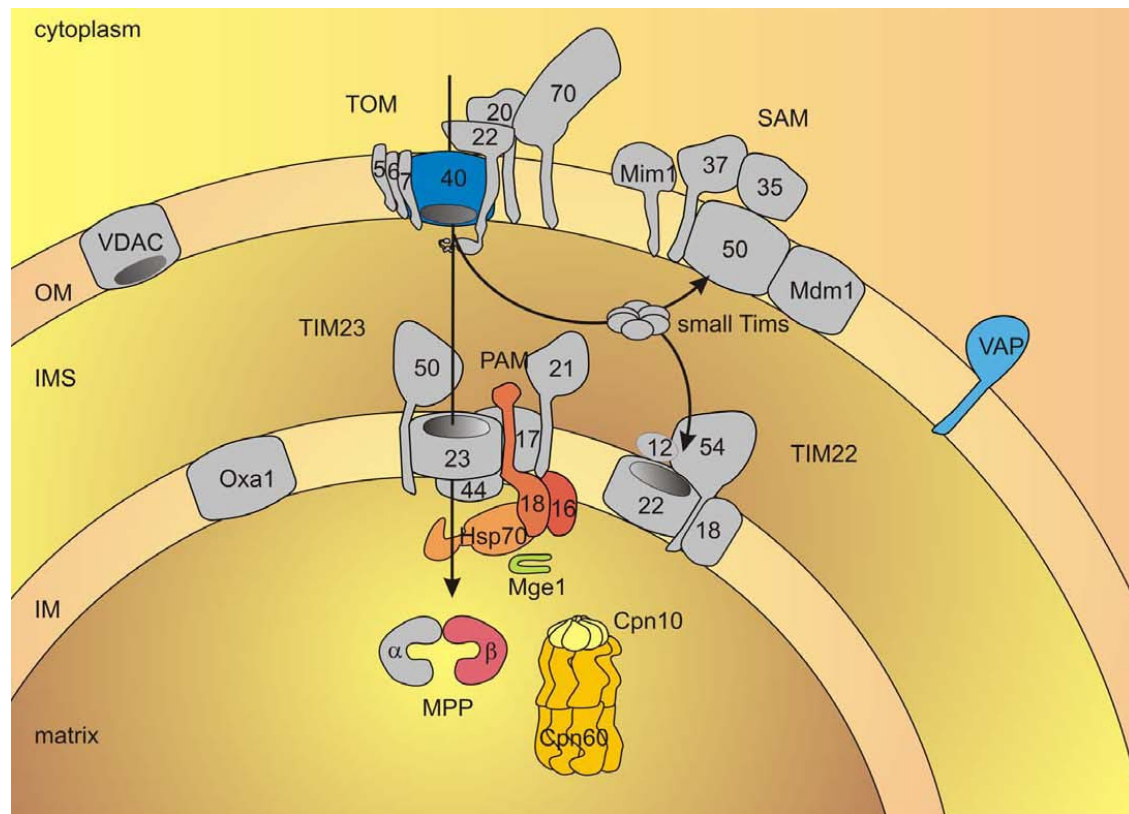
### C.2.1 Morphologies

Les mitosomes sont des organites ovoïdes, délimités par une double membrane, qui ne présentent pas de crêtes (Figure 30). Ils sont généralement plus petits que les mitochondries ou les hydrogénosomes, leur taille variant entre 50 et 500 nm de diamètre selon les espèces. Les mitosomes de *T. hominis* qui mesurent environ 50 x 90 nm, sont en effet plus petits que ceux de *C. parvum*, qui ont une taille de 150 à 300 nm (Riordan *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2002).

Le nombre de mitosomes par cellule varie également entre les espèces. Alors que *E. histolytica* et *G. intestinalis* peuvent contenir entre 25 et 150 mitosomes par cellules, *C. parvum* ne contient qu'un seul mitosome. La microsporidie *T. hominis* en comporte environ 28, alors que la microsporidie *Encephalitozoon cuniculi* présente apparemment moins de 10 mitosomes par cellule (Hjort *et al.*, 2010). Peu d'informations sont actuellement disponibles sur la ségrégation de ces organites lors de la division cellulaire, mais compte tenu de leur nombre restreint chez *C. parvum* et *E. cuniculi*, l'existence d'un mécanisme précis de séparation et de multiplication des mitosomes dans chacune des cellules filles doit probablement exister (Hjort *et al.*, 2010).

### C.2.2 Capacité métabolique des mitosomes

La découverte relativement récente des mitosomes conduit au fait que peu de données sont connues sur les fonctions physiologiques de ces organites. Les mitosomes sont retrouvés chez des organismes la plupart du temps anaérobies ou microaérophiles, dépourvus de mitochondrie ou d'hydrogénosome, suggérant que ces organites sont mutuellement exclusifs. Les données génomiques et biochimiques montrent que ces organites, comme les hydrogénosomes, sont dépourvus de génome, mais qu'ils ne semblent pas avoir de rôle direct avec la production d'ATP (Embley and Martin, 2006). La plupart des organismes comportant des mitosomes réalisent en effet leur synthèse d'ATP dans le cytoplasme, en utilisant la même machinerie enzymatique que les hydrogénosomes (PFOR,



**Figure 31. Représentation schématique du système d'import putatif des protéines du mitosome de *Giardia intestinalis*.** Les protéines identifiées comme étant présentes dans l'organelle sont représentées en couleurs. Les protéines connues pour participer au système d'import mitochondrial sont colorées en gris. Abréviations : OM, membrane externe; IMS, espace intermembranaire; IM, membrane interne; TOM, système de translocation de la membrane externe; SAM, machinerie d'insertion et d'assemblage des protéines de la membrane externe; TIM, système de translocation de la membrane interne; PAM, auxiliaire de translocation; MPP, peptidase mitochondriale; VAP, protéine membranaire associée à la fusion des vésicules. VDAC, pore voltage-dépendant. D'après Jedelsky et al., 2011.

hydrogénase à fer, ASCT, SCS). Notons que la PFOR et l'hydrogénase à fer d'*E. histolytica* et de *G. intestinalis* ne possèdent pas de pré-séquences caractéristiques du système d'import des protéines mitochondriales, ce qui peut expliquer leur localisation cytoplasmique, et la production d'hydrogène moléculaire en l'absence d'hydrogénosome (Lloyd *et al.*, 2002).

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs protéines d'origine mitochondriale ont été mises en évidence au sein des mitosomes. C'est le cas des protéines chaperonnes mitochondriales Hsp70, Hsp60, respectivement impliquées dans la machinerie d'import des protéines dans l'organite, et dans le repliement des protéines importées. La cardiolipine, lipide particulier typiquement mitochondrial, également retrouvé dans la membrane des hydrogénosomes, a également été localisée dans la membrane interne du mitosome de *G. intestinalis* (Lloyd *et al.*, 2002), renforçant l'idée que cet organite dérive d'une mitochondrie ancestrale.

La découverte la plus importante concernant la biologie des mitosomes est la démonstration directe que ces organites sont impliqués dans la biosynthèse des centres Fe/S et leur incorporation dans des protéines Fe/S fonctionnelles (Tovar *et al.*, 2003). Cette activité d'assemblage des centres Fe/S et sa localisation au sein des mitosomes a également été démontrée chez les microsporidies *T. hominis* et *E. cuniculi* (Goldberg *et al.*, 2008).

Les mitosomes semblent également utiliser un système d'import des protéines semblable à celui des mitochondries. En effet, chez les microsporidies, et notamment *Antonospora locustae*, des données montrent la présence de plusieurs protéines impliquées dans le système d'import et de translocation des protéines chez la mitochondrie. Ces mêmes études démontrent également que certaines protéines mitosomales peuvent être reconnues et transloquées dans la mitochondrie de *S. cerevisiae*, suggérant que les mitosomes et les mitochondries utilisent un système comparable d'import des protéines (Burri *et al.*, 2006). Toutefois, une très récente étude faisant état du protéome du mitosome de *G. intestinalis* (Jedelsky *et al.*, 2011) montre un système d'import simplifié par rapport à celui retrouvé dans les mitochondries classiques (Figure 31).



La présence de MCF (Mitochondrial Carrier family), un groupe de protéines membranaires permettant le passage de certaines molécules à travers la membrane interne mitochondriale, a également été décrite chez le mitosome de certaines microsporidies. Ces protéines sont essentiellement connues aux travers des échangeurs ADP/ATP, et permettent une communication étroite entre la mitochondrie et le cytoplasme, la mitochondrie fournissant l'ATP nécessaire aux activités métaboliques se déroulant dans le cytoplasme. De tels transporteurs ont pu être mis en évidence dans les mitosomes d'*A. locustae* et d'*E. cuniculi*, démontrant que le mitosome, qui à la différence de la mitochondrie est incapable de produire sa propre énergie, est susceptible d'importer l'ATP provenant du cytoplasme, nécessaire à son métabolisme (Tsaousis *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2008).

Il semble donc que les mitosomes soient, de la même manière que les hydrogénosomes, des organites dérivés des mitochondries. Le protéome du mitosome de *G. intestinalis* fait état de deux grandes voies métaboliques typiquement mitochondriales : l'assemblage des protéines à centre Fe/S, et la présence d'un système d'import mitochondrial simplifié nécessaire à son métabolisme (Jedelsky *et al.*, 2011). L'ensemble des données recueillies sur l'étude des mitosomes reflète une réduction du métabolisme mitochondrial, qui n'a retenu que le métabolisme lié à l'assemblage des centres Fe/S. Certains auteurs suggèrent que ce métabolisme représente probablement la pression de sélection conduisant à la rétention de l'endosymbionte mitochondrial dans toutes les lignées eucaryotes (Embley *et al.*, 2003; Tovar *et al.*, 2003), expliquant le fait que tous les eucaryotes connus à ce jour comportent un organite à double membrane dérivé d'une mitochondrie ancestrale.

### **C.3 Mitochondrie *versus* hydrogénosome : une distinction est-elle nécessaire ?**

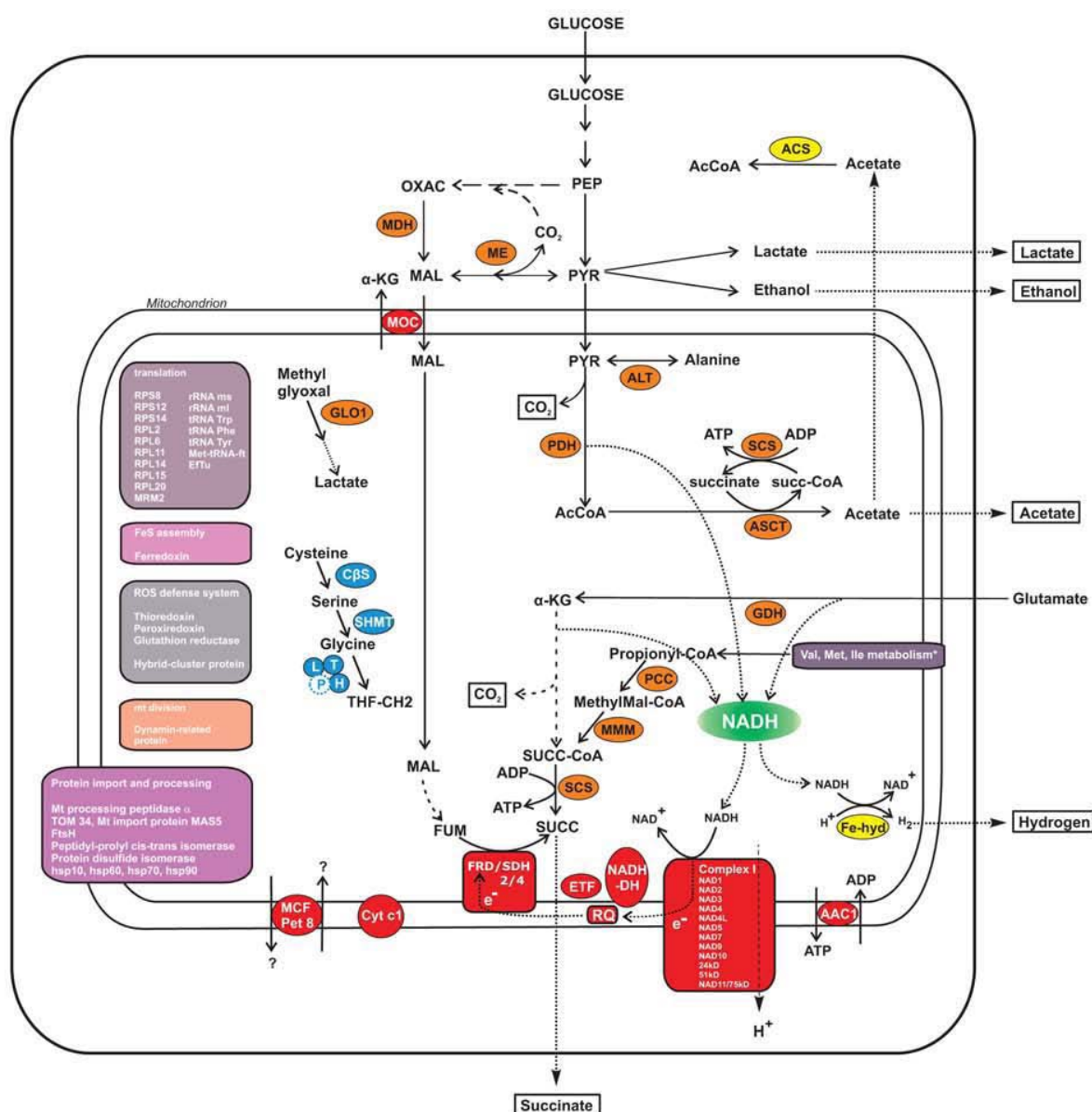
Nous avons vu au cours de nos différentes analyses que les hydrogénosomes sont définis comme étant des organites à double membrane exempts de génome, producteurs d'ATP et d'hydrogène. Ces organites ont été décrits chez des flagellés parasites



(*Tritrichomonas foetus*, *Trichomonas vaginalis*), des ciliés (*Nyctotherus ovalis*), et chez certains chytridiomycètes (*Neocallimastix* sp.). Il est intéressant de noter que les hydrogénosomes sont retrouvés chez une grande variété d'eucaryotes mais sont absents chez des organismes contenant des mitochondries, suggérant que ces deux organites sont mutuellement exclusifs. Le point commun des organismes comportant des hydrogénosomes, ayant pourtant une distribution phylogénétique relativement éloignée, demeure dans le caractère anaérobie de leur environnement de survie. Le métabolisme des hydrogénosomes est en effet un métabolisme anaérobie, qui consiste en la décarboxylation oxydative du malate ou du pyruvate en acétate, en CO<sub>2</sub> et en hydrogène moléculaire H<sub>2</sub>, celui-ci étant accompagné d'une production d'ATP par un phénomène de phosphorylation au niveau du substrat. La voie métabolique responsable de cette production d'énergie est semblable à celle des mitochondries anaérobies. En effet, la production d'ATP par les hydrogénosomes est également réalisée grâce à l'activité enzymatique de la SCS et de l'ASCT.

Contrairement aux mitochondries, les hydrogénosomes ne contiennent ni cytochrome, ni cycle de Krebs, et ne contiennent pas non plus de chaîne de phosphorylation oxydative, excepté certaines sous-unités du complexe I. Ces organites sont de plus caractérisés par deux enzymes spécifiques, la PFOR responsable de la décarboxylation du pyruvate, et l'hydrogénase à fer, conduisant à la production d'H<sub>2</sub>. Leur morphologie est également différente de celle des mitochondries, puisque la membrane interne des hydrogénosomes ne comporte pas de crêtes. Pourtant, ces organites producteurs d'hydrogène semblent comporter un certain nombre de similarités avec les métabolismes mitochondriaux. Les études génomiques et expérimentales menées notamment sur le métabolisme de l'hydrogénosome de *T. vaginalis*, montrent en effet que celui-ci a un rôle dans l'assemblage des protéines à centres Fe/S, dans le stockage du calcium cellulaire, et dans le métabolisme des acides aminés. Les hydrogénosomes, hormis la particularité de certaines enzymes, ne sont donc pas si différents des mitochondries. Le cas de l'hydrogénosome de *N. ovalis* est particulièrement intéressant pour illustrer cette idée.



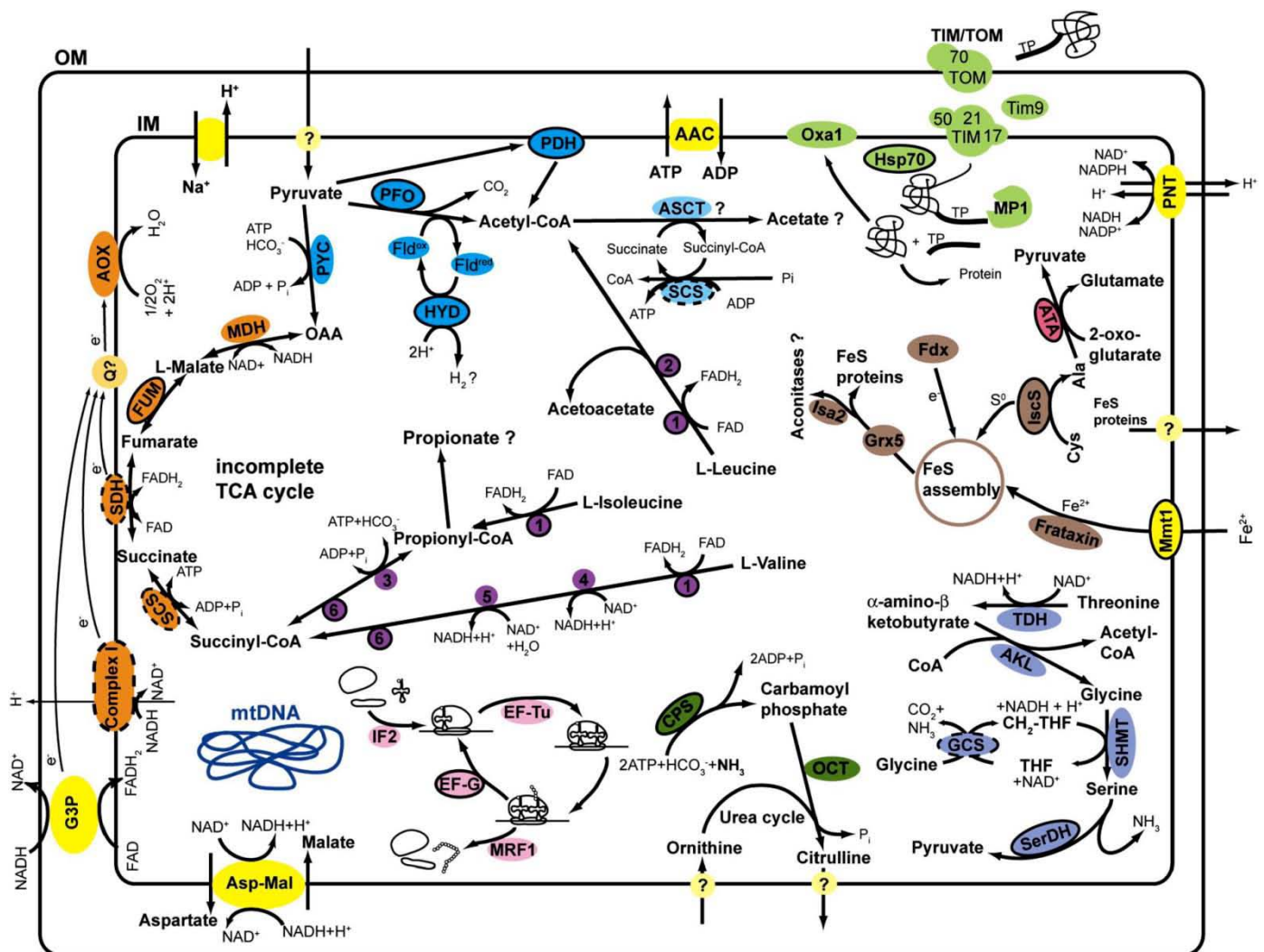


**Figure 32. Reconstruction métabolique *in silico* de l'hydrogénosome de *Nyctotherus ovalis*.**

En rouge : chaîne de transporteurs d'électrons composée du complexe I et du complexe II (activité FRD), et transporteurs mitochondriaux membranaires. En bleu : métabolisme de clivage de la glycine. En orange : métabolismes de décarboxylation du pyruvate, de production d'ATP, et de dégradation des acides aminés. Abréviations : AAC, transporteur ADP/ATP; ACS, acétyl-CoA synthétase; ALT, alanine aminotransférase; ASCT, acétate:succinate-CoA transférase; Cyt c 1, cytochrome c 1; CβS, cystathionine β synthétase; ETF, flavoprotéine transférant des électrons; Fe-hyd, hydrogénase à fer; FRD/SDH, fumarate réductase/succinate déshydrogénase; GDH, glutamate déshydrogénase; GLO1, glyoxalase I; MCF Pet 8, transporteur mitochondrial membranaire; MDH, malate déshydrogénase; ME, enzyme malique; MMM, méthylmalonyl-CoA mutase; MOC, transporteur malate/oxoglutarate; NADH-DH, NADH:quinone oxydoréductase; PCC, propionyl-CoA carboxylase; PDH, pyruvate déshydrogénase; RQ, ridoquinone; SCS, succinyl-CoA synthétase; SHMT, sérine hydroxyméthyltransférase. D'après de Graaf et al., 2011.

L'organite de ce cilié anaérobie comporte en effet de nombreuses caractéristiques mitochondriales. En effet, la membrane interne forme des crêtes allongées, ressemblant à celles des mitochondries de ciliés aérobies. De plus, il a récemment été montré la présence d'un génome de 46,7 kpb dans la matrice de ces hydrogénosomes, codant pour des ARN et des protéines ribosomales, et certaines sous-unités du complexe I. Néanmoins, il est important de noter que ce génome, à la différence de ses homologues mitochondriaux, ne comporte aucun gène codant pour les complexes III, IV et pour l'ATP synthase (de Graaf *et al.*, 2011). Le génome nucléaire de *N. ovalis* code pour certaines protéines typiquement mitochondriales, comme la PDH ou certaines sous-unités du complexe II. L'hydrogénosome de *N. ovalis* semble donc comporter une chaîne de transporteurs d'électrons composée des complexes I et II, ce dernier présentant une activité FRD, de la même manière que les mitochondries anaérobies respirant le fumarate (Figure 32). Les données génomiques révèlent également l'existence de gènes codant pour des protéines connues pour être impliquées dans de nombreux métabolismes et mécanismes mitochondriaux, comme le métabolisme de certains acides aminés, l'assemblage des centres Fe/S, le système de clivage de la glycine, le système d'import des protéines, ou la défense contre le stress oxydant (Figure 32).

Le nom d'hydrogénosome donné à l'organite de *N. ovalis* est donc justifié pour sa capacité à produire de l'hydrogène moléculaire (grâce à la présence d'une hydrogénase à fer), à la similarité de la voie de production de l'ATP (par phosphorylation au niveau du substrat), mais semble être relativement différent des hydrogénosomes « traditionnels », compte tenu de certaines particularités, telles que l'absence de PFOR (remplacée par une PDH) ou la présence d'un génome de type mitochondrial. Il apparaît ainsi que l'hydrogénosome de *N. ovalis* comporte un lien métabolique très fort avec la mitochondrie anaérobie retrouvée chez certains helminthes parasites (*Fasciola hepatica*, *Ascaris suum*). L'observation de ses caractéristiques mitochondriales, combinée à sa capacité à produire de l'hydrogène moléculaire, peut nous conduire à penser que cet organite constitue un intermédiaire entre la mitochondrie et l'hydrogénosome. Les auteurs des derniers travaux



**Figure 33. Reconstruction métabolique *in silico* du MLO de *Blastocystis* sp.**

Les protéines comportant un signal d'import mitochondrial sont entourées en noir, les complexes protéiques pour lesquels seulement certaines sous-unités présentent un signal d'import sont entourés en pointillés. En bleu : métabolismes liés au pyruvate et la production d'ATP. En jaune : transporteurs mitochondriaux membranaires. En orange : cycle de Krebs partiel, chaîne de transporteurs d'électrons composée du complexe I, II, et d'une oxydase alternative. En rose : protéines impliquées dans les phénomènes de transcription et de traduction. En vert : cycle mitochondrial de l'urée. En violet : métabolisme lié aux acides aminés. En vert clair : système d'import des protéines. En marron : métabolisme d'assemblage des centres Fe/S. En bleu clair : métabolisme de clivage de la glycine. Abréviations : 1, transaminase; 2, isovaléry-CoA déshydrogénase; 3, propionyl-CoA carboxylase; 4, 3-hydroxyisobutyrate déshydrogénase; 5, aldéhyde déshydrogénase; 6, méthylmalonyl-CoA mutase. AAC, transporteur ADP/ATP; AKL, 2-amino-3-cétobutyrate-CoA ligase; AOX, oxydase alternative; ASCT, acétate:succinate-CoA transférase; Asp-Mal, transporteur aspartate/malate; ATA, alanine transaminase; CPS, carbamoylphosphate synthétase; EF-G, facteur d'élongation G; EF-Tu, facteur d'élongation Tu; Fdx, ferrédoxine; Fld, flavodoxine; FUM, fumarate hydratase; G3P, transporteur glycérol-3-phosphate; GCS, système de clivage de la glycine avec les protéines L, T, P et H; Grx5, glutarédoxine; Hsp70, chaperonne mitochondriale 70 kDa; IF2, facteur d'initiation de la traduction; IscS, cystéine désulfurase; Isa2, protéine IscA liant le fer; MDH, malate déshydrogénase; Mmt1, transporteur de fer putatif; MP1, métalloprotéase 1; OCT, ornithine carbamoyltransférase; Oxa1, oxydase impliquée dans l'assemblage des protéines dans la membrane interne; PNT, pyridine-nucléotide transhydrogénase; PYC, pyruvate carboxylase; Q, quinone; SCS, succinyl-CoA synthétase; SDH, succinate déshydrogénase; SerDH, sérine déshydrogénase; SHMT, sérine hydroxyméthyltransférase; TDH, thréonine déshydrogénase; TP, signal d'import. D'après Stechmann et al., 2008.

menés sur le métabolisme de cet organite particulier n'utilisent d'ailleurs plus le terme « hydrogénosome », mais le qualifient de mitochondrie productrice d'hydrogène (de Graaf *et al.*, 2011).

La singularité de l'organite de *N. ovalis* n'est pas un cas isolé. Les organites à double membrane de *Blastocystis* sp., connus sous le nom de Mitochondrion-Like Organelles (MLOs) présentent en effet une situation comparable. Les MLOs de ce straménopile anaérobie présentent une morphologie proche des mitochondries. La membrane interne forme effectivement des crêtes pouvant être apparentées à celles de certaines mitochondries. De manière similaire à l'hydrogénosome de *N. ovalis*, les MLOs de *Blastocystis* sp. possèdent également un génome de type mitochondrial. Le séquençage de ce génome, réalisé pour des isoats des sous-types 1 (ST1), 4 (ST4) et 7 (ST7), révèle une taille comprise entre 27,7 et 29,3 kpb (Perez-Brocal and Clark, 2008; Wawrzyniak *et al.*, 2008)<sup>1</sup>. De forme circulaire, le génome des MLOs code pour une partie de la machinerie de traduction, et certaines sous-unités du complexe I, mais ne comporte, à la différence des génomes mitochondriaux d'autres straménopiles, aucun gène codant pour les complexes III, IV et pour l'ATP synthase.

Durant mes travaux de thèse, des données apportées par l'analyse d'une banque d'EST (Stechmann *et al.*, 2008) ont mis en évidence 113 protéines potentiellement importées aux MLOs, et montrent que l'organite de *Blastocystis* sp. comporte un métabolisme très similaire à celui des mitochondries. Celui-ci semble en effet comporter une chaîne de transporteurs d'électrons composée des complexes I et II, un cycle de Krebs incomplet, et de nombreux métabolismes caractéristiques des mitochondries, tels que le métabolisme de certains acides aminés, le système de clivage de la glycine, le cycle mitochondrial de l'urée, l'assemblage des centres Fe/S, le système d'import des protéines (Figure 33). Les MLOs comportent néanmoins des enzymes caractéristiques des hydrogénosomes impliquées dans la décarboxylation du pyruvate et la production d'ATP (hydrogénase à fer, PFOR, ASCT, SCS). Il est cependant intéressant de noter l'existence du

---

<sup>1</sup> La publication liée à l'analyse de la structure détaillée du génome du MLO de *Blastocystis* sp. ST7 fera l'objet d'un chapitre de ce manuscrit.



complexe PDH, dont la fonction n'est pas encore comprise. Les études de localisation de certaines protéines hydrogénosomales montrent que l'hydrogénase à fer et la PFOR sont effectivement présentes au sein des MLOs (Stechmann *et al.*, 2008; Wawrzyniak *et al.*, 2008). Néanmoins, aucune activité de type hydrogénase n'a pu être mise en évidence (Lantsman *et al.*, 2008). Ce résultat n'est peut être pas lié à l'absence d'activité (ce qui poserait la question de la fonction de cette hydrogénase à fer), mais tout simplement à la trop faible sensibilité de la méthode utilisée (Lantsman *et al.*, 2008). Une méthode par spectrométrie de masse a en effet été nécessaire pour la mise en évidence de la production d'hydrogène cytoplasmique de *Giardia* sp., qui est dix fois plus faible que celle décelée chez *Trichomonas* sp. L'absence de production d'hydrogène par l'organite de *Blastocystis* sp. conduit par conséquent à le qualifier de MLO, et non d'hydrogénosome (Hjort *et al.*, 2010).

La description d'organites aussi singuliers que ceux de *N. ovalis* et de *Blastocystis* sp. fournit des exemples frappants de l'évolution et de l'adaptation des hydrogénosomes et des MLOs à leurs environnements, à partir de leur ancêtre mitochondrial. L'existence de tels organites a récemment été montrée chez le flagellé anaérobie *Trimastix pyroformis* (Hampl *et al.*, 2008), et les amibes *Mastigamoeba balamuthi* (Gill *et al.*, 2007), et *Sawyeria marylandensis* (Barbera *et al.*, 2010), qui comportent également des enzymes typiquement hydrogénosomales et mitochondriales. Ces organites particuliers décrits jusqu'ici, ne représentent probablement que la pointe de l'iceberg de la diversité des organites apparentés aux mitochondries qui restent à découvrir (Hjort *et al.*, 2010). Ceux-ci nous montrent que notre « catégorisation » conduisant à séparer la mitochondrie de l'hydrogénosome est obsolète, et révèlent plutôt un continuum évolutif des fonctions biochimiques des mitochondries et de leurs homologues.



## D. L'histoire des protéines chaperonnes dans l'évidence phylogénétique d'un ancêtre mitochondrial primitif

L'ensemble des mitochondries décrites jusqu'ici comportent un génome, correspondant vraisemblablement à une partie du génome de l' $\alpha$ -protéobactérie endosymbiotique ancestrale (*Rickettsia prowazekii*). Cette différence de contenu génique peut être expliquée par un transfert massif de gènes vers le génome nucléaire durant la transition entre l'endosymbionte et l'organe mitochondrial que l'on connaît aujourd'hui (Herrmann, 2003). Les hydrogénosomes et les mitosomes sont également des organites à double membrane comme la mitochondrie, mais sont décrits comme étant dépourvus de génome. Pourtant, les organismes possédant ce genre d'organites comportent tous dans leur génome des gènes codant pour des protéines connues pour être présentes dans les mitochondries. Certains de ces gènes, notamment ceux codant pour des protéines chaperonnes mitochondriales, sont hautement conservés, et constituent de ce fait de bons candidats pour des analyses phylogénétiques (Gupta, 1995). Les protéines chaperonnes permettent l'importation des protéines à l'organe et leur maturation structurale. Parmi celles-ci, trois sont conservées dans la plupart des eucaryotes : Cpn60, Cpn10 et Hsp70.

De manière intéressante, les gènes codant pour ces trois protéines ont été identifiés dans le génome nucléaire de *T. vaginalis*, et les études phylogénétiques révèlent que ces gènes sont d'origine mitochondriale. Ces données suggèrent donc fortement que *T. vaginalis* a abrité un endosymbionte mitochondrial au cours de son évolution. Les gènes codant pour les protéines Cpn60 et Hsp70 ont également été identifiés chez des organismes comportant des mitosomes, comme *Giardia lamblia*, *Entamoeba* sp., *Cryptosporidium parvum* et montrent un lien phylogénétique avec leurs homologues mitochondriaux. La protéine Hsp70 a été identifiée chez de nombreuses espèces microsporidiennes (comportant aussi des mitosomes), comme *Antonospora locustae*, *Trachipleistophora hominis*, *Encephalitozoon cuniculi*, et *Encephalitozoon hellem*, et les études de la séquence des gènes codant cette protéine révèlent un lien avec celle des  $\alpha$ -protéobactéries (Shiflett and Johnson, 2010).





Il semble donc que les organismes possédant des hydrogénosomes ou des mitosomes ont conservé des gènes provenant d'un endosymbionte de type mitochondrial. Cette observation renforce par conséquent le fait que les hydrogénosomes et les mitosomes soient issus d'une mitochondrie ancestrale, ayant subi d'importantes modifications métaboliques et morphologiques, liées aux pressions de sélection dues aux diverses niches écologiques et à l'évolution des organismes.



# Chapitre II

## Résultats expérimentaux

*« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi! »*

*Albert Einstein*



## **I. Séquençage du génome complet de *Blastocystis* sp.**

### **A. La génomique, pour une meilleure connaissance des organismes**

La génomique est une discipline qui vise à étudier de manière exhaustive les génomes, tant en ce qui concerne le nombre, la disposition et la séquence précise des gènes (génomique structurale), que leurs produits et leurs fonctions (génomique fonctionnelle). Le déchiffrement des génomes, complété par des données de transcriptomique, de protéomique et de métabolomique, engendre une profusion de données complexes, et modifie de façon très profonde les approches de la biologie liées à la connaissance de la physiologie des êtres vivants. Ainsi, l'ensemble de ces disciplines en « omique » ne conduit pas à l'étude d'une seule entité particulière comme un gène ou une protéine, mais aux réseaux géniques et aux interactions protéiques, nous livrant certaines clefs du déterminisme des grands processus cellulaires et de leur intégration au niveau de l'organisme dans son ensemble. Les données fournies par la génomique permettent également d'éclaircir de façon déterminante les principes sous-jacents au développement, à l'adaptation aux conditions environnementales, ou encore à la filiation évolutive des organismes.

Le nombre de génomes eucaryotes séquencés à ce jour est relativement faible par rapport aux génomes bactériens et archaebactériens disponibles dans les bases de données. Les génomes eucaryotes présentent effectivement une taille et une complexité beaucoup plus importante que les génomes procaryotes, impliquant l'utilisation d'outils de séquençage, d'assemblage et de bioanalyses plus conséquents. Cette différence s'explique d'une part, par la présence d'un plus grand nombre de gènes (composés d'exons et d'introns), et d'autre part par l'existence de régions intergéniques et de séquences répétées de tailles parfois très importantes, augmentant la complexité des étapes de séquençage, d'assemblage et d'annotation (Carlton, 2003). Les avancées technologiques des dix dernières années issues de l'évolution des connaissances en physique, informatique, chimie et en nano-biotechnologie, visant à réduire le coût et le temps nécessaire pour le séquençage des



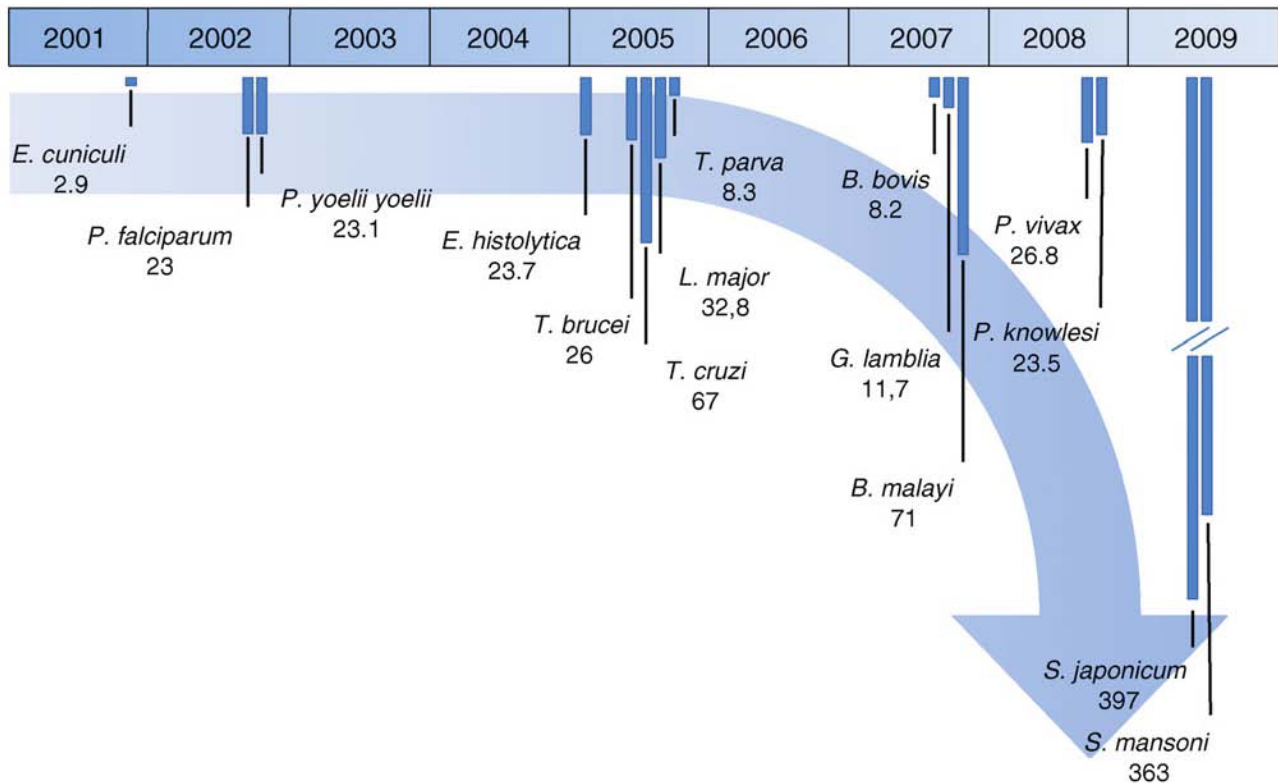
génomomes, ont permis un véritable bond en avant. En effet, l'optimisation et la robotisation de techniques de séquençage déjà existantes, comme la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977; Smith, 1986), ou la méthode de pyroséquençage (Hyman, 1988; Ronaghi *et al.*, 1998a; Ronaghi *et al.*, 1998b), et l'avènement récent de nouvelles méthodologies de séquençage à haut débit, comme la technologie 454 mise au point par la société Life Sciences (Branford, USA), ou le procédé Illumina développé par la firme Illumina (Sandiego, USA), ont conduit à une augmentation significative du nombre de génomes eucaryotes séquencés.

La constitution d'un inventaire exhaustif des gènes contenus dans un génome est la principale raison des programmes de séquençage. La connaissance des gènes et de leur(s) fonction(s) est en effet une étape indispensable à la compréhension des phénomènes biologiques au niveau moléculaire et cellulaire. La connaissance du génome de certains organismes modèles, comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* ou *Arabidopsis thaliana*, ont ainsi permis d'apporter de précieuses données sur la physiologie et le développement de ces organismes. Le séquençage du génome humain a par exemple permis d'identifier de nombreuses voies physiologiques impliquées dans certaines maladies génétiques (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Les applications liées à la génomique sont multiples et concernent des domaines aussi variés que la recherche fondamentale, la médecine, l'agriculture, les industries pharmaceutiques, biotechnologiques, et agroalimentaires.

## **A.1 La génomique en parasitologie**

La génomique est également une discipline de plus en plus présente dans le domaine de la parasitologie, notamment pour l'étude de la physiologie de certains agents responsables de maladies infectieuses humaines et/ou animales. Ainsi, bon nombre de génomes de protozoaires pathogènes d'intérêt médical ou vétérinaire ont été séquencés ou sont en cours de séquençage, certains étant responsables de maladies parasitaires graves, comme la trypanosomiase africaine (plus communément appelée maladie du sommeil)





**Figure 34. Génomes des principaux eucaryotes pathogènes séquencés au cours des dix dernières années.** Les barres bleues symbolisent les différents parasites dont les génomes ont été séquencés. La hauteur des barres est proportionnelle à la taille de leur génome. Les nombres figurant en-dessous du nom d'espèce des parasites représentent la taille du génome en Mpb. Noter l'augmentation globale de la taille des génomes séquencés au cours du temps. Parasites figurant sur ce schéma : *Encephalitozoon cuniculi*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium yoelii yoelii*, *Entamoeba histolytica*, *Theileria parva*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, *Brugia malayi*, *Giardia lamblia*, *Babesia bovis*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*. Modifiée d'après Webster et al., 2010.

causée par *Trypanosoma brucei* (Berriman *et al.*, 2005), ou le paludisme causé par *Plasmodium falciparum* (Gardner *et al.*, 2002) (Figure 34). Parmi ces protozoaires parasites, nous pouvons également citer certains génomes de microsporidies (*Encephalitozoon cuniculi*), d'apicomplexes (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. yoelli*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*), de kinétoplastidés (*Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, *T. vivax*, *Leishmania major*), de diplomonadines (*Giardia lamblia*), d'amoebozoaires (*Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *E. invadens*), ou encore de parabasalides (*Trichomonas vaginalis*). Les génomes de quelques métazoaires parasites ont aussi été séquencés, comme ceux de *Brugia malayi* ou *Schistosoma mansoni* pour n'en citer que certains (Carlton, 2003).

La plupart des protozoaires parasites de l'homme comportent un génome d'une taille inférieure à 100 Mpb, conférant un avantage non négligeable dans les processus de séquençage, d'assemblage et d'annotation, notamment en termes de temps d'analyse. Des banques d'EST sont également régulièrement utilisées en parasitologie, et permettent de fournir de précieuses données sur l'identification préliminaire de nombreux gènes, et sur le transcriptome global lorsque peu de données génomiques sont disponibles (El-Sayed *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2002; Stechmann *et al.*, 2008).

## **A.2 Données génomiques et identification de molécules antiparasitaires**

De nombreuses études témoignent du rôle prépondérant des données apportées par le séquençage du génome de certains parasites dans l'identification de protéines pouvant constituer des cibles thérapeutiques potentielles. L'analyse du génome de *P. falciparum* a par exemple permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse de type II des acides gras (Waller *et al.*, 1998; Waller *et al.*, 2003). Cette voie métabolique, localisée au niveau de l'apicoplaste, est commune aux chloroplastes des plantes et aux bactéries mais est absente chez les mammifères. Surolia et collaborateurs ont pu montrer, *in vitro*, que des molécules antifongiques et antibactériennes comme le triclosan, étaient capables d'inhiber de manière spécifique l'activité de l'énoyl-ACP réductase, conduisant à un arrêt de la

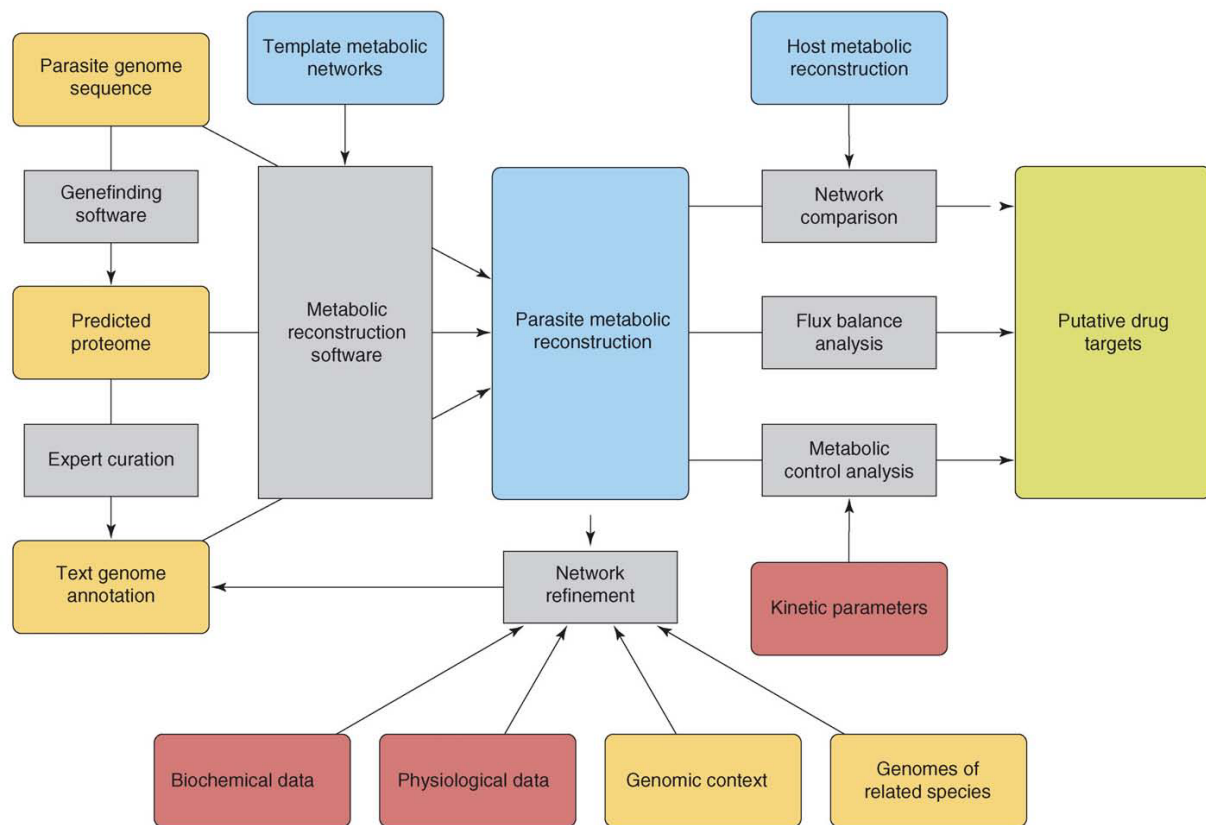


synthèse de type II des acides gras, et à la mort du parasite (Surolia and Surolia, 2001). D'autres molécules montrant une activité anti-malaria ont également été découvertes grâce à l'exploitation des données génomiques de *P. falciparum*, comme la fosmidomycine ou l'acide S-farnésyl-thiosalicylique, capables d'inhiber la biosynthèse des isoprénoïdes et la croissance du parasite *in vitro* et *in vivo* (Jomaa et al., 1999; Rodrigues Goulart et al., 2004).

Cette volonté d'utiliser les données génomiques afin de mettre en évidence des cibles thérapeutiques potentielles n'est pas exclusive à *Plasmodium*. Cette stratégie est également adoptée pour d'autres parasites, comme les protozoaires *Trypanosoma* sp. et *Leishmania* sp. (Castillo et al., 2010), ou les helminthes *Schistosoma* sp. et *Brugia malayi* (Blaxter et al., 2002; Franco et al., 2000). Les données de séquençage permettent également l'identification de gènes qui codent pour des protéines pouvant être impliquées dans les mécanismes de virulence, ou dans la mise en place de structures cellulaires particulières, essentielles au cycle de développement de certains parasites.

Par exemple, l'analyse du génome d'*Entamoeba histolytica* a permis de mettre en évidence l'intégralité des gènes codant pour des cystéines protéases, des enzymes reconnues pour être des facteurs de virulence. Il est intéressant de noter qu'un tiers de ces gènes sont propres à *E. histolytica*, et ne comportent aucun homologue connu chez les eucaryotes supérieurs (Bruchhaus et al., 2003). Ces protéines spécifiques du parasite peuvent ainsi constituer des cibles de choix pour la mise en place de drogues pour lutter contre l'amibiase.

De même, grâce au séquençage du génome du parasite intestinal *Giardia intestinalis*, la plupart des gènes codant les protéines de la paroi kystique ont été identifiés (Sun et al., 2003). L'infection par *G. intestinalis* débute en effet par l'ingestion de kystes par l'hôte, permettant la survie du parasite lors de son transit dans l'estomac. L'identification de l'ensemble de ces protéines peut par conséquent conduire à l'élaboration de drogues capables d'interférer avec l'assemblage des protéines impliquées dans la formation de la paroi kystique, et ainsi interférer avec le cycle de vie du parasite.



**Figure 35. Schéma récapitulatif permettant d'accéder à la reconstruction métabolique d'un parasite à partir du séquençage de son génome.** La couleur de chacune des cases indique la nature de la source des données : en rouge, données expérimentales; en jaune, données dérivant des séquences génomiques; en bleu, données organisées en réseaux; en vert, mise en évidence de cibles thérapeutiques potentielles. D'après Pinney et al., 2007.

Les exemples utilisés ici, dans le but de présenter le caractère important de la génomique pour la mise en évidence de molécules antiparasitaires, font implicitement intervenir un aspect métabolique, nécessaire à la compréhension des voies biochimiques, et à l'identification des enzymes qui les constituent.

### **A.3 Annotation fonctionnelle et reconstruction métabolique**

L'extraordinaire quantité de données apportées par l'annotation d'un génome conduit à apporter un sens biologique à ces informations, en intégrant l'ensemble des capacités protéiques et enzymatiques de ce génome dans des réseaux métaboliques, afin de tenter d'expliquer les relations existant entre le génotype et le phénotype. Nous pouvons citer à titre d'exemples les études concernant le séquençage des génomes de *P. falciparum* et de *T. brucei*. La prédiction de l'ensemble des enzymes annotées a en effet permis une reconstruction métabolique préliminaire, montrant notamment le caractère particulier du métabolisme énergétique de ces parasites, et de la capacité de celui-ci à pouvoir conduire à la mise au point de molécules anti-parasitaires (Berriman *et al.*, 2005; Yeh *et al.*, 2004). La reconstruction et la modélisation métabolique, particulièrement complexes chez les organismes parasites, impliquent une qualité relativement importante du séquençage et de l'annotation du génome.

Cependant, les données génomiques ne conduisent qu'à une reconstruction prédictive, reflétant les capacités métaboliques totales d'un organisme, mais ne permettent pas d'intégrer de manière temporelle les différents métabolismes, certains étant tributaires du stade de développement du parasite et/ou des modifications de l'environnement dans lequel évolue l'organisme. Il est donc indispensable d'apporter des données expérimentales biochimiques et physiologiques afin de confirmer ou d'infirmer les analyses d'annotation fonctionnelle issues du séquençage (Figure 35). La reconstruction métabolique constitue le point de convergence entre les informations issues de l'analyse du génome et celles apportées par les procédés expérimentaux tels que la transcriptomique ou la protéomique,



créant une complémentarité entre les deux types d'informations. Les données expérimentales peuvent en effet mettre en évidence des faux-positifs issus de l'annotation des gènes, dans le cas par exemple de la prédiction d'une fonction enzymatique isolée. A l'inverse, celles-ci peuvent aussi permettre de compléter une voie métabolique d'intérêt comportant une enzyme manquante, en prouvant expérimentalement l'activité de cette enzyme, signifiant que le gène codant pour cette protéine n'a pas été assigné, mais dont l'existence s'impose pour le bon fonctionnement de cette chaîne métabolique.

La plupart des stratégies de reconstruction métabolique *in silico* consistent en l'analyse automatique du protéome global de l'organisme étudié, issu de l'annotation complète du génome, par l'utilisation de logiciels bioinformatiques de prédiction et de modélisation de voies métaboliques. C'est le cas notamment du logiciel Pathway Tools (Karp *et al.*, 2002), utilisé pour la création de bases de données de schémas métaboliques provenant du séquençage de nombreux génomes, tels que *P. falciparum* (Yeh *et al.*, 2004), *Arabidopsis thaliana* (Mueller *et al.*, 2003), ou *Homo sapiens* (Romero *et al.*, 2005). Un autre exemple est le logiciel KAAS (KEGG Automatic Annotation Server), qui permet la reconstruction de cartes métaboliques (Aoki-Kinoshita and Kanehisa, 2007; Moriya *et al.*, 2007). Le caractère automatique de la prédiction métabolique par ce type d'outils est sans conteste un avantage considérable en termes de temps de traitement et d'analyse des données. Néanmoins, ces logiciels ne fournissent qu'une reconstruction métabolique préliminaire, dépendante de la qualité de l'annotation réalisée. Il est donc parfois nécessaire d'affiner les résultats manuellement, en effectuant des recherches par BLAST (Altschul *et al.*, 1997) contre des bases de données génomiques existantes, afin d'identifier des orthologues fonctionnels. Ceci permet ainsi d'allouer une fonction enzymatique à un gène dont l'annotation était à l'origine absente ou incorrecte.

Il apparaît donc que la qualité de la reconstruction métabolique *in silico* soit très fortement dépendante de l'étape d'annotation du génome de l'organisme étudié. Cette étape est limitante, particulièrement dans l'analyse des génomes de parasites, en raison de la grande divergence des séquences pouvant exister entre des gènes orthologues. Les





logiciels d'annotation actuels comportent une caractéristique clef afin de palier à ce type de difficulté, résidant dans l'application des techniques de génomique comparative, réalisées entre plusieurs génomes déjà séquencés (Maltsev *et al.*, 2006). Ceci permet une amélioration significative de l'étape d'annotation fonctionnelle.

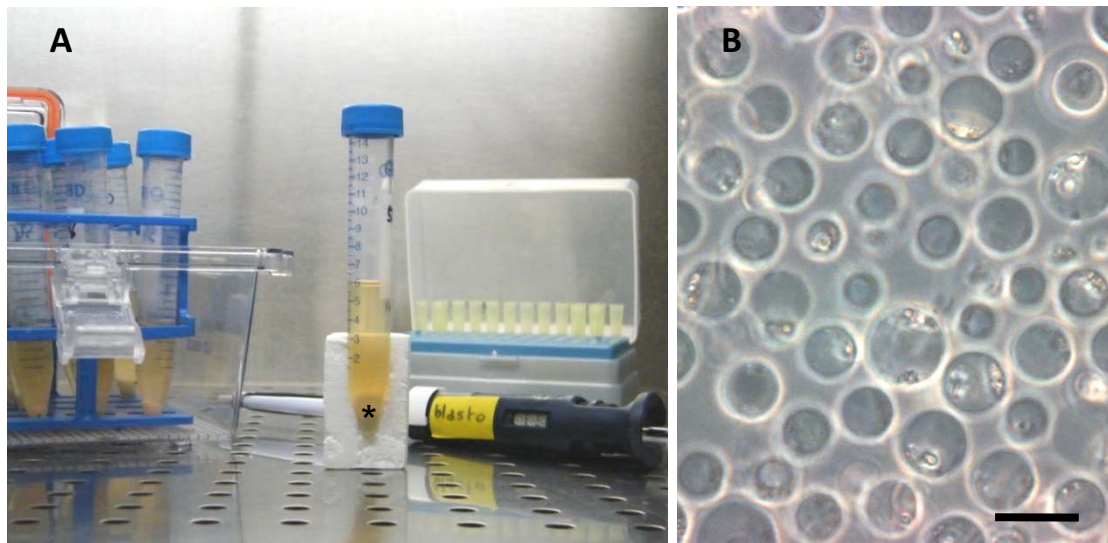
La génomique comparative ne permet pas seulement le perfectionnement des méthodes d'annotation fonctionnelle. Celle-ci permet également d'apporter de nouvelles connaissances en parasitologie, notamment sur les caractéristiques physiologiques et évolutives des organismes parasites.

#### **A.4 Lorsqu'un seul génome ne suffit pas : la génomique comparative**

L'analyse comparative de plusieurs génomes permet d'apporter de nouvelles données là où les informations apportées par un seul génome semblent limitées. La génomique comparative permet en effet de couvrir un vaste champ d'investigation, en comparant la composition globale de plusieurs génomes, leur organisation chromosomique, la synténie de certaines régions conservées, l'identification de gènes orthologues et paralogues, l'étude de gènes spécifiques à une espèce, ou encore l'évolution des organismes (Carlton, 2003). Les projets de séquençage tendent donc de plus en plus vers le séquençage simultané de génomes de plusieurs espèces, ou d'organismes phylogénétiquement proches.

Cette constatation peut être facilement illustrée par l'exemple du séquençage du génome de plusieurs espèces appartenant au genre *Entamoeba*. Le séquençage des génomes d'*E. dispar*, et *E. histolytica* (Loftus *et al.*, 2005) a en effet permis d'identifier les gènes responsables de la virulence de l'espèce pathogène *E. histolytica*, et l'absence de tels gènes chez l'espèce *E. dispar*, amibe considérée comme non pathogène (Carlton, 2003).

La génomique comparative reste une discipline relativement récente. Le premier projet de génomique comparative a été réalisé à partir du séquençage du génome de deux parasites du même genre, *P. falciparum* responsable de la malaria humaine et *P. yoelii yoelii*



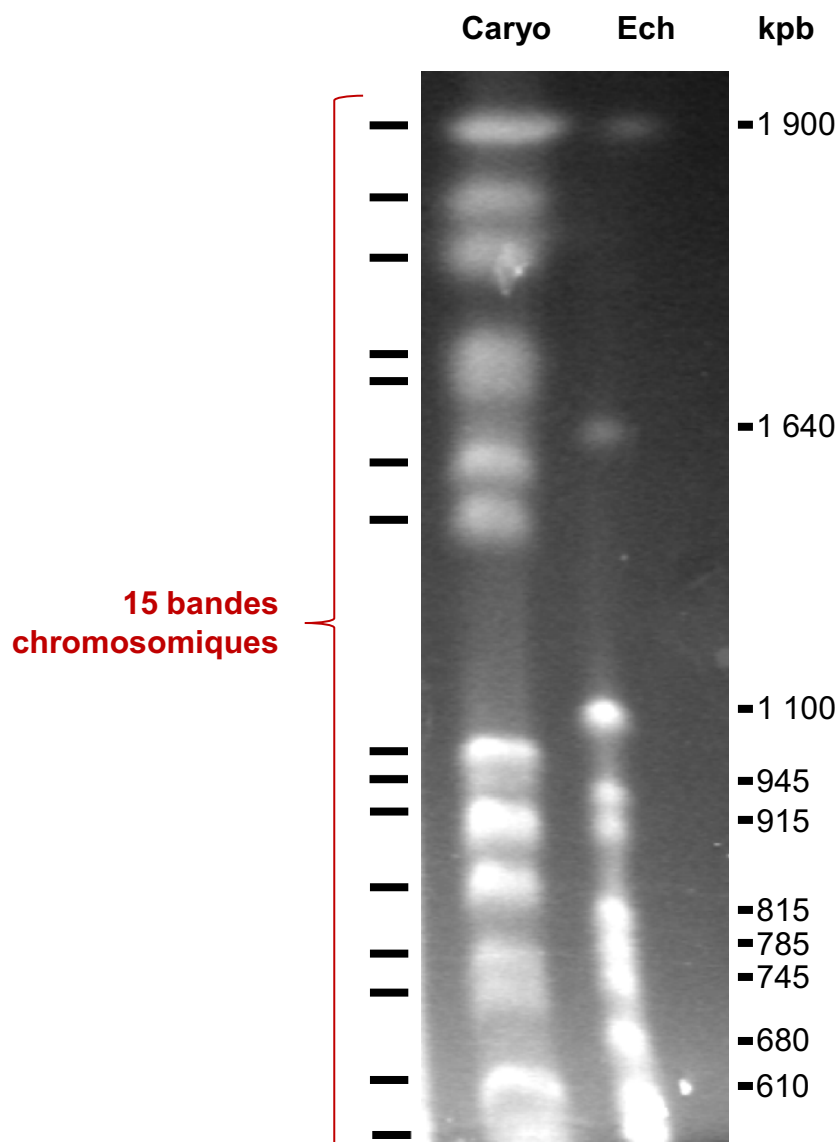
**Figure 36. Culture de la forme vacuolaire de *Blastocystis* sp. sous-type 7 (ST7) au laboratoire.** (A) Les cellules de *Blastocystis* sp. ST7 cultivées en jarres anaérobies (à gauche de la photo), sédimentent et se divisent au fond du tube (astérisque). Noter la couleur jaune du milieu en fin de culture témoignant d'une acidification du milieu lors de la croissance du parasite. (B) Observation en microscopie photonique de formes vacuolaires provenant d'une culture axénique. Echelle : 20  $\mu$ m.

responsable de la même maladie chez le rongeur (Carlton *et al.*, 2002). La comparaison globale des deux génomes a montré plusieurs similarités. Les deux génomes sont haploïdes, composés de 14 chromosomes linéaires, et 60% des gènes sont orthologues entre les deux espèces. La comparaison des gènes prédits révèle que les deux espèces possèdent des caractéristiques similaires pour les régions codantes et non codantes, comme par exemple le pourcentage en adénine et thymine (A/T %). Il est cependant intéressant de noter que les gènes spécifiques de chacune des espèces sont ceux codant des protéines jouant un rôle dans la variation antigénique et l'évasion au système immunitaire de l'hôte. Il apparaît donc clairement que ces deux espèces appartenant au genre *Plasmodium*, ont sélectionné de manière différente leurs gènes, conditionnant ainsi des mécanismes de défense adaptés à l'environnement hostile de leur hôte respectif. La génomique comparative permet ainsi d'enrichir nos connaissances sur l'évolution des organismes et leur adaptation aux conditions environnementales dans lesquelles ils vivent.

## **B. Article 1 – Séquençage du génome complet de *Blastocystis* sp. ST7**

L'isolat de *Blastocystis* sp. utilisé pour le projet de séquençage, réalisé en collaboration avec l'Institut de Génomique du CEA à Evry (Génoscope, Université d'Evry), provient des selles d'un patient symptomatique originaire de Singapour, et correspond au sous-type 7 (ST7) de la terminologie établie par Stensvold et collaborateurs (Stensvold *et al.*, 2007b).

Le parasite (sous sa forme vacuolaire) est cultivé au laboratoire de manière axénique à 37°C, dans un milieu IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Medium) supplémenté en sérum de cheval 10% (Figure 36). La culture de *Blastocystis* sp. est relativement contraignante, et inclut l'utilisation de jarres, liées au caractère anaérobie du parasite. Celui-ci semble cependant tolérer les repiquages réalisés sous PSM (Poste de Sécurité Microbiologique), mais oblige l'opérateur à réaliser la manipulation rapidement. Afin d'éliminer la présence de



**Figure 37. Profil caryotypique de *Blastocystis* sp. sous-type 7 (ST7).**

Paramètres électrophorétiques : 15h pulse 90s, 15h pulse 150s, 15h pulse 200s, 20h pulse 300s. La migration est réalisée à 150V et à une température de 10°C. La visualisation des bandes chromosomiques est réalisée sous ultraviolets (254 nm), après un traitement au bromure d'éthidium (BET). Abréviations : caryo, caryotype; Ech, échelle de poids moléculaires correspondant au caryotype de *Saccharomyces cerevisiae*.

dioxygène dans le milieu de culture, ce dernier est préalablement réduit pendant 48h à 37°C en jarres anaérobies, avant d'être utilisé pour la culture du parasite.

Le séquençage et l'annotation du génome d'un parasite, nous l'avons vu, permettent d'apporter une énorme quantité d'informations sur les caractéristiques structurales, physiologiques et métaboliques de l'organisme étudié. Ces données peuvent ensuite être utilisées pour la découverte de cibles thérapeutiques potentielles, ou la mise en évidence de facteurs de virulence. Le séquençage du premier génome de *Blastocystis* sp. a ainsi été principalement motivé par la volonté de mettre en évidence des gènes pouvant coder pour des facteurs de virulence (protéases, immunophilines), afin d'apporter des éléments de réponse sur le caractère potentiellement pathogène de ce microorganisme. La présence d'organites morphologiquement similaires aux mitochondries chez un organisme pourtant anaérobie, a également éveillé notre curiosité, et nous a conduit à réaliser la reconstruction *in silico* du métabolisme des MLOs à partir des données d'annotation du génome.

La connaissance approximative de la taille du génome à séquencer est une prérogative nécessaire et essentielle au lancement des protocoles de séquençage et d'annotation. Nous avons donc procédé à des analyses caryotypiques en champ pulsé (PFGE) à partir d'extractions d'ADN génomique de *Blastocystis* sp. Les profils obtenus indiquent la présence de 15 bandes chromosomiques (d'une taille allant de 600 kpb à 2 Mpb), conduisant à un génome d'une taille estimée à 17 Mpb (Figure 37).

Les résultats de séquençage et d'assemblage (couverture de 16,5x) ont permis de déduire une taille de 18,8 Mpb, ce qui fait du génome de *Blastocystis* sp. ST7 le plus petit génome straménopile séquencé à ce jour (*Phytophthora infestans*, 240 Mpb ; *P. sojae*, 95 Mpb ; *P. ramorum*, 65 Mpb ; *Phaeodactylum tricornutum*, 27,4 Mpb ; *Thalassiosira pseudonana*, 34,5 Mpb). L'annotation révèle une structure génomique particulière, et met en évidence des gènes (obtenus par transferts horizontaux pour certains) codant pour des protéines potentiellement impliquées dans l'adaptation du parasite à son environnement intestinal, notamment aux conditions d'anaérobiose. La prédiction des protéines sécrétées



par le parasite dans le milieu extérieur met en avant de nombreuses protéases, immunophilines, et glycosyltransférases, dont les activités pourraient conduire à une altération de la physiologie de l'hôte, ce qui pourrait expliquer les complications gastro-intestinales observées pour certaines infections à *Blastocystis*. Ces hypothèses doivent toutefois être démontrées expérimentalement, afin d'apporter des données concrètes sur la physiopathologie et les interactions que peut présenter ce protozoaire parasite avec son hôte.





RESEARCH

Open Access

# Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite

France Denoeud<sup>1†</sup>, Michaël Roussel<sup>2,3†</sup>, Benjamin Noel<sup>1</sup>, Ivan Wawrzyniak<sup>2,3</sup>, Corinne Da Silva<sup>1</sup>, Marie Diogon<sup>2,3</sup>, Eric Viscogliosi<sup>4,5,6,7</sup>, Céline Brochier-Armanet<sup>8,9</sup>, Arnaud Couloux<sup>1</sup>, Julie Poulain<sup>1</sup>, Béatrice Segurens<sup>1</sup>, Véronique Anthouard<sup>1</sup>, Catherine Texier<sup>2,3</sup>, Nicolas Blot<sup>2,3</sup>, Philippe Poirier<sup>2,3</sup>, Geok Choo Ng<sup>10</sup>, Kevin SW Tan<sup>10</sup>, François Artiguenave<sup>1</sup>, Olivier Jaillon<sup>1</sup>, Jean-Marc Aury<sup>1</sup>, Frédéric Delbac<sup>2,3</sup>, Patrick Wincker<sup>1\*</sup>, Christian P Vivarès<sup>2,3\*</sup> and Hicham El Alaoui<sup>2,3\*</sup>

## Abstract

**Background:** *Blastocystis* is a highly prevalent anaerobic eukaryotic parasite of humans and animals that is associated with various gastrointestinal and extraintestinal disorders. Epidemiological studies have identified different subtypes but no one subtype has been definitively correlated with disease.

**Results:** Here we report the 18.8 Mb genome sequence of a *Blastocystis* subtype 7 isolate, which is the smallest stramenopile genome sequenced to date. The genome is highly compact and contains intriguing rearrangements. Comparisons with other available stramenopile genomes (plant pathogenic oomycete and diatom genomes) revealed effector proteins potentially involved in the adaptation to the intestinal environment, which were likely acquired via horizontal gene transfer. Moreover, *Blastocystis* living in anaerobic conditions harbors mitochondria-like organelles. An incomplete oxidative phosphorylation chain, a partial Krebs cycle, amino acid and fatty acid metabolisms and an iron-sulfur cluster assembly are all predicted to occur in these organelles. Predicted secretory proteins possess putative activities that may alter host physiology, such as proteases, protease-inhibitors, immunophilins and glycosyltransferases. This parasite also possesses the enzymatic machinery to tolerate oxidative bursts resulting from its own metabolism or induced by the host immune system.

**Conclusions:** This study provides insights into the genome architecture of this unusual stramenopile. It also proposes candidate genes with which to study the physiopathology of this parasite and thus may lead to further investigations into *Blastocystis*-host interactions.

## Background

*Blastocystis* sp. is one of the most frequent unicellular eukaryotes found in the intestinal tract of humans and various animals [1]. This anaerobic parasite was first described by Alexeieff at the beginning of the 20th century [2]. For a long time, the taxonomy of *Blastocystis* was controversial. Despite the application of molecular phylogenetic approaches, it was only recently that

*Blastocystis* sp. was unambiguously classified within the stramenopiles [3-5]. This eukaryotic major lineage, also called Heterokonta, encompasses very diverse organisms (unicellular or multicellular, heterotrophic or photosynthetic) such as slime nets, diatoms, water moulds and brown algae [6]. One important characteristic of stramenopiles is the presence during the life cycle of a stage with at least one flagellum permitting motility. It is important to note that *Blastocystis* sp. does not possess any flagellum and is the only stramenopile known to cause infections in humans [4]. For the organism isolated from human fecal material, Brumpt suggested the name *Blastocystis hominis* [7]. However, as the species *B. hominis* is difficult to establish, we use the term '*Blastocystis* sp.' to designate any subtype observed in

\* Correspondence: pwincker@genoscope.cns.fr; christian.vivares@univ-bpclermont.fr; hicham.el\_alaoui@univ-bpclermont.fr

† Contributed equally

<sup>1</sup>Genoscope (CEA) and CNRS UMR 8030, Université d'Evry, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France

<sup>2</sup>Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Full list of author information is available at the end of the article

humans. *Blastocystis* sp. is the most frequent protozoa reported in human fecal samples [8], with a worldwide distribution [9-13] and a prevalence ranging between 30 and 60% in some developing countries [1]. In addition, infection with *Blastocystis* sp. appears to be common and more severe in immunocompromised or hemophilic patients [9,14,15]. The presence of *Blastocystis* representatives has also been reported in a variety of mammals, birds, reptiles, and even insects [16-18]. *Blastocystis* sp. exhibits extensive genetic diversity, and on the basis of molecular analysis of the small subunit RNA gene, ten distinct subtypes (ST1 to ST10) have been identified from primates (including humans), other mammals and birds [17]. Some arguments support zoonotic transmission to humans, including the high prevalence of ST1 to ST3 in humans and other mammals [17] and the experimental transmission of different human genotypes to chickens, rats and mice [19,20].

The life cycle of *Blastocystis* sp. remains elusive, although different morphological forms have been described, including vacuolar, granular, amoeboid and cysts. Recently, Tan [1] suggested a life cycle with the cyst as the infectious stage. After ingestion of cysts, the parasite may undergo excystation in the gastrointestinal tract and may develop into a vacuolar form that divides by binary fission. The following stage could be either the amoeboid form or the granular form. Then, encystation may occur during passage along the colon before cyst excretion in the feces. Therefore, *Blastocystis* sp. lives in oxygen-poor environments and is characterized by the presence of some double-membrane surrounded-organelles showing elongate, branched, and hooked cristae [21] called mitochondria-like organelles (MLOs) [22]. These cellular compartments contain a circular DNA molecule and have metabolic properties of both aerobic and anaerobic mitochondria [23,24].

*Blastocystis* sp. has been reported as a parasite causing gastro- and extra-intestinal diseases with additional persistent rashes, but a clear link of subtypes to the symptomatology is not well established [11]. Other studies have shown that the parasite can be associated with irritable bowel syndrome [20,25] or inflammatory bowel disease [26]. Thus, the pathogenic role of *Blastocystis* sp. as the primary cause of enteric symptoms is dubious. Therefore, it is important to search for other molecular markers for an epidemiologically integrated study [17]. Here we report the complete genome sequence of a subtype 7 isolate from a Singaporean patient [GenBank: CABX01000000]. Its comparison with the two other available stramenopile genome sequences (that is, *Phytophthora sojae*, a plant pathogenic oomycete, and *Thalassiosira pseudonana*, a free diatom) allows us to highlight some genome-specific features of *Blastocystis* to understand how this parasite evolved within

environmental constraints, but also provides a better knowledge of its metabolic and physiological capacities, such as the functioning and the role of MLOs and the arsenal produced to interact or to counter immune defense systems of its host.

## Results and discussion

### General features of the *Blastocystis* genome

The genome of a *Blastocystis* subtype 7 was resolved by pulsed-field gel electrophoresis, and 15 chromosomal bands have been characterized. The final assembled sequence is distributed in 54 scaffolds and the deduced genome is 18.8 Mb in size (16.5-fold sequence coverage), which is much smaller than plant parasite stramenopiles (*Phytophthora infestans*, 240 Mb; *P. sojae*, 95 Mb; *Phytophthora ramorum*, 65 Mb) and also smaller than free stramenopiles (*Phaeodactylum tricornutum*, 27.4 Mb; *T. pseudonana*, 34.5 Mb). The reference annotation of the *Blastocystis* subtype 7 genome contains 6,020 genes, covering about 42% of the genome (Table 1). The average number of exons per gene is 4.6 for multiexonic genes and 929 genes are monoexonic. Compaction in this parasite genome is reflected by the short length of the intergenic regions (1,801 bp), the relatively low repeat coverage (25%) and, more strikingly, by the very short size of introns, with a sharp length distribution of around 32 nucleotides (Figure S1 in Additional file 1). A total of 38 rDNA units organized in transcriptional units, including a small subunit rRNA gene, a 5.8S rRNA gene, and a large subunit rRNA gene in a 5'-3' orientation, have been detected in the genome. The sizes of the small subunit, the large subunit and the 5.8S rRNA gene are 1.8 kb, 2.45 kb and 0.44 kb, respectively. Some units are tandemly duplicated, up to four copies on scaffold 18, and some may also be localized in subtelomeric regions, as revealed by a co-mapping of telomeric sequences and rDNA subunits at scaffold 6 and 9 extremities. These two scaffolds could correspond to entire chromosomes. Due to the sequencing method, some units are incomplete (either truncated or lacking genes). The alignment of 20 complete small subunit rRNA genes shows polymorphism between copies, which is also the case for 29 large subunit rRNA gene copies.

The number of genes in *Blastocystis* (6,020) is reduced in comparison with other stramenopiles (*P. infestans*, 17,797; *P. sojae*, 19,027; *P. ramorum*, 15,743; *P. tricornutum*, 10,402; *T. pseudonana*, 11,776). Surprisingly, a large portion of genes were probably duplicated since 404 clusters of paralogous protein-coding genes were identified, containing 1,141 genes, that is, 19% of *Blastocystis* genes (see Material and methods). Excluding the large multigenic families (up to 32 genes with a histone-fold domain and 20 genes with a 4Fe-4S ferredoxin domain), most of the duplicated genes are present in only two copies (Figure S2 in

**Table 1 General features of *Blastocystis* sp. subtype 7**

	Number	Mean length	Median length	Total length (Mb)	Percentage of genome (18.8 Mb)
Genes	6,020	1,299	1,397	7.82	42%
Exons	24,580	280	150	6.88	37%
Introns	18,560	50.5	31	0.94	5%
Intergenic	-	1,801	4,092	10.9	58%
Repeats	2,730	1,747	2,862	4.8	25%

Additional file 1). As described in other organisms [27,28], the duplicated genes are more conserved than single copy genes in *Blastocystis* sp. Indeed, they have more orthologs (defined as best reciprocal hit (BRH); see Materials and methods) and display higher similarities with their orthologs (Figure S3 in Additional file 1). They also tend to display higher expression levels than single copy genes (Figure S4 in Additional file 1).

We investigated whether these gene duplications could have arisen from a whole genome duplication (WGD) or smaller scale segmental duplications. WGD, the duplication of the entire genome by polyploidization, has been shown to have played a key role in the evolutionary history of several animal and plant lineages [27,29-31]. Segmental duplications occur continually by several mechanisms that can duplicate parts of genes, entire genes, or several adjacent genes. These mechanisms include unequal crossing over, or gene conversion, and tandem duplication [32-34]. We were able to identify 320 blocks of duplicated genes, that is, paralogous segments of several adjacent genes (see Materials and methods), some of which are very large (up to 100 kb), suggesting a WGD. These blocks cover about 39% of the genome (7.3 out of 18.8 Mb) representing 38% (5.15 out of 13.65 Mb) of the unrepeat fraction of the genome. As shown in Figure 1, each scaffold is a mosaic of blocks of homology with several other scaffolds: scaffolds cannot be grouped by pairs as would be expected from a recent WGD. Additionally, some segments are present in more than two copies in the genome (they appear in black in Figure 1), suggesting that segmental duplications are likely to have played a role in the current duplication pattern. However, the duplicated blocks are not often on the same scaffold, nor in tandem, which rules out the tandem duplication model. The comparison of paralogous copies shows surprisingly high nucleic acid identity rates: on average, 99% in coding regions, 98.4% in untranslated regions, and 97.8% in introns and intergenic regions. Interestingly, those values are homogeneous among all paralogous blocks, suggesting that all blocks were duplicated at the same time.

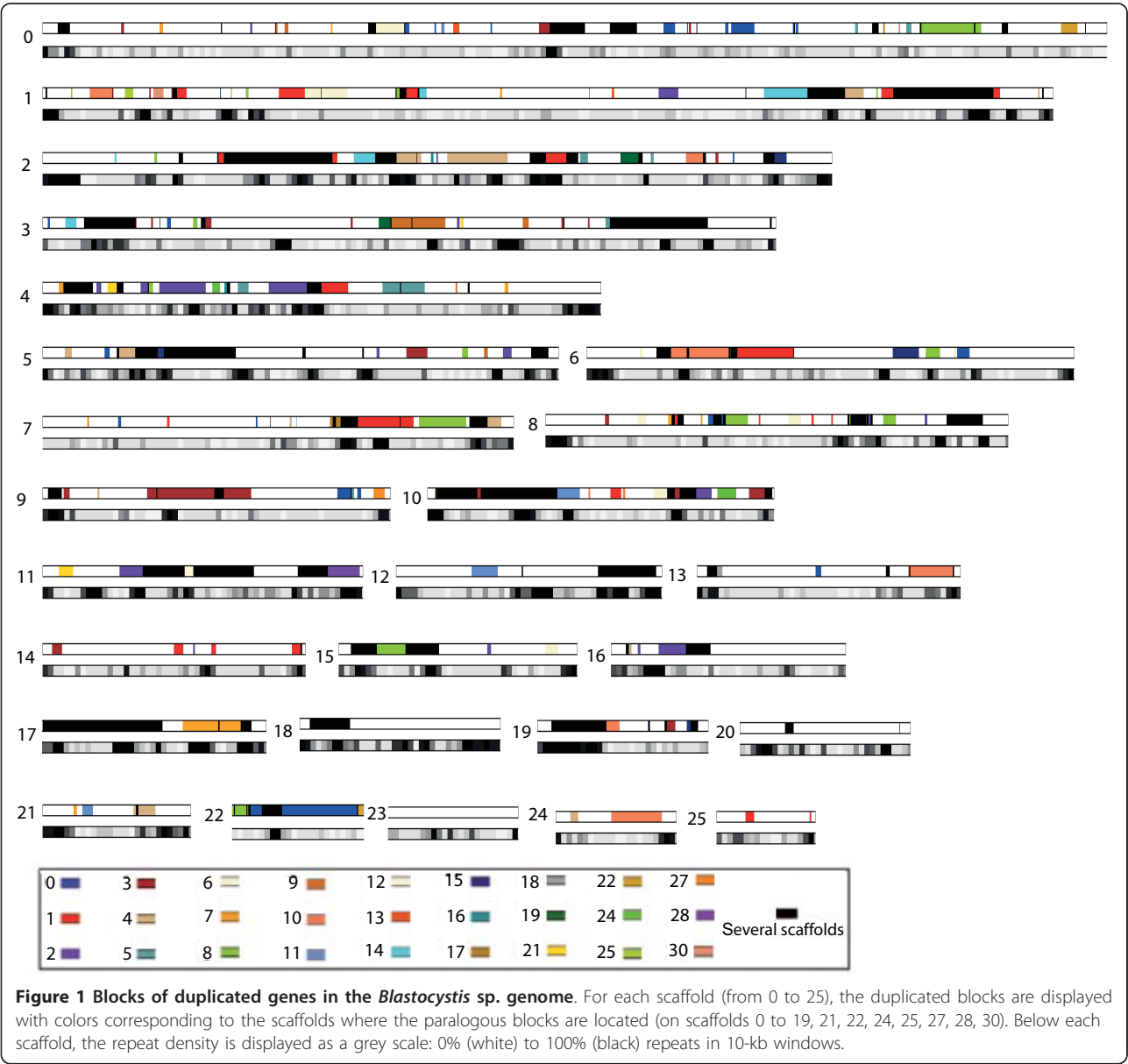
Two hypotheses could explain the origin of these duplicated blocks. First, the duplicates may have arisen from a whole genome duplication that took place recently (since

the copies are still very similar) and was followed by rapid genome rearrangements and losses of gene copies. The high homology between gene copies could also result from a high rate of homogenization through gene conversion driven by the high frequency of rearrangements. The frequent rearrangements in the *Blastocystis* lineage are probably also the reason why no extensive synteny could be detected between *Blastocystis* sp. and other stramenopiles. Second, the duplicates could also have occurred through segmental duplications (favored by the high rate of rearrangements), although the relatively uniform divergence between copies is more symptomatic of a single event and would imply a burst of segmental duplications during a short period or a very high rate of homogenization by recombination. The intriguing pattern of gene duplications, likely caused by the high rate of rearrangements in the *Blastocystis* genome, makes it impossible to determine which scenario is the most likely. It could be interesting to sequence other subtypes to determine whether the high rate of recombination (loss of synteny) and the pattern of duplications observed in subtype 7 is a common feature within this lineage.

#### Endosymbiotic and horizontal gene transfers in *Blastocystis* sp

Phylogenetic analyses revealed two genes of possible cyanobacterial origin in the genome of *Blastocystis*, those encoding phosphoglycerate kinase [GenBank: CBK20833] and 6-phosphogluconate dehydrogenase [GenBank:CBK22626] (Figure S5 in Additional file 1). It is important to notice that 6-phosphogluconate dehydrogenase-encoding genes have been identified in non-photosynthetic protists such as *Heterolobosea* (not shown). This was interpreted as secondary horizontal gene transfer (HGT) from photosynthetic eukaryotes to *Heterolobosea* [35,36].

The presence of plastids in various photosynthetic stramenopile lineages (for example, diatoms, chrysophytes, raphidophytes) was interpreted as a secondary endosymbiosis that occurred between a red algae and the ancestor of these groups. By contrast, the evolutionary meaning of the lack of plastids in some heterotrophic stramenopile lineages (for example, oomycetes, bicospesids) is still under discussion: does it indicate secondary losses of the



plastid acquired by the ancestor of all stramenopiles? Or does it reflect the fact that the secondary endosymbiosis at the origin of stramenopile plastids did not occur in their common ancestor but after the divergence of heterotrophic lineages [37]? The presence of genes of cyanobacterial origin in *Blastocystis* supports the first hypothesis even if we can not rule out possible recent acquisitions of genes of chloroplastic origin from photosynthetic eukaryotes as in the case of Heterolobosea.

HGT is important in evolution as an adaptive mechanism of microbial eukaryotes to environmental conditions [38,39] and is known to play an important role in stramenopiles. For instance, iron is a limiting nutrient in surface waters for diatoms. Therefore, the likely acquisition of

ferritin by HGT from bacteria has permitted some species to acquire this nutrient from the environment [40]. This is also the case for the diatom *Phaeodactylum*, in which nitrogen metabolism, cell wall silification, DNA replication, genome repair and recombination processes have been shaped by HGT [40,41]. HGT seems also to play an important role in oomycetes since it may be involved in osmotrophy. Genes involved in absorbing products of degradation of complex nutrients were predicted to be candidates for fungi-to-oomycete HGT [42]. By analyzing the set of predicted genes in *Blastocystis* sp. that are homologous to bacterial or archaeal genes, we identified 133 candidates for HGT (Table S3 in Additional file 2). In most cases, our phylogenetic analyses



confirm the bacterial origin of these genes even if they were not sufficiently resolved to allow the precise identification of the donor, suggesting that these HGT events were ancient and/or that the corresponding genes are rapidly evolving in the genome of *Blastocystis* sp. Interestingly, in a few cases, even when the transferred gene is of bacterial origin, the *Blastocystis* sp. copy is closely related to homologues found in pathogenic and/or anaerobic eukaryotes, suggesting that HGT between eukaryotes has played a key role in these organisms too (Figure S6 in Additional file 1).

Some of the genes that originated from HGT possess functions that lead to a better understanding of how this lineage emerged. Three are homologous to the bacterial major facilitator transporter (MFS\_1), the first two being nearly identical, and therefore resulting from a recent gene duplication event. MFS proteins form a large and diverse group of secondary transporters, which facilitate the transport across membranes of a variety of substrates, including ions, sugar phosphates, drugs, neurotransmitters, nucleosides, amino acids and peptides [43]. Two *Blastocystis* MFS genes have closely related homologues in some pathogenic eukaryotes like the Alveolata *Perkinsus marinus* or fungi such as *Gibberella zeae* and *Verticillium albo atrum*, suggesting an acquisition from bacteria followed by HGT between these eukaryotes (Figure S6f in Additional file 1). However, the phylogeny resolution is too low to precisely identify the bacterial donor of these genes. The presence of MSF proteins in *Blastocystis* sp. may confer the ability to absorb nutrients from the environment to this parasite, particularly in the intestinal lumen or when attacking host tissues. We have also found different HGT genes harboring alcohol deshydrogenase, short-chain dehydrogenase and oxidoreductase domains (Table S3 in Additional file 2) that may be involved in specific fermentations that remain to be characterized. Some of them are closely related to homologues found in anaerobic eukaryotes like *Trichomonas vaginalis* and *Entamoeba histolytica* (Figure S6b in Additional file 1) or in the bacteria *Legionella pneumophila* or *Parachlamydia acanthamoebae*, which infect or are associated with amoeba [44,45]. These enzymes may increase the range of *Blastocystis* sp. metabolic abilities to produce energy in anaerobic environments, as has been observed in *Giardia lamblia* and *E. histolytica* [46,47].

Several genes acquired by HGT may participate in the adhesion of the parasite to the host tissues. Indeed, 26 genes (Table S3 in Additional file 2) encode proteins containing the IPR008009 domain, which is often associated with immunoglobulin domains, a conserved core region of an approximately 90-residue repeat found in several hemagglutinins and other cell surface proteins. Among these 26 *Blastocystis* sp. proteins, some also contain the IPR015919 domain, which characterizes

cadherins, a family of adhesion molecules that mediate  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cell-cell adhesion. Homologous genes are also found in some beta-Proteobacteria or Acidobacteria, but the sequences are very divergent and our phylogenetic analysis did not, therefore, allow firm identification of the bacterial donor. Some hydrolase-encoding genes could also result from the transfer from bacteria to *Blastocystis* sp. One of them possesses an esterase-lipase (IPR013094) domain (Table S3 in Additional file 2) and may participate in the degradation of host tissue during infection. The closest homologues of this gene are found in the fungus *Botryotinia fuckeliana*, in Firmicutes and Actinobacteria (Figure S6d in Additional file 1).

Overall, these HGT genes may have allowed flexibility in genome expression, enabling the successful adaptation of *Blastocystis* sp. to digestive environments through genes encoding proteins that could be involved in osmotrophy (MFS), energy metabolism (dehydrogenases) and adhesion.

#### Circular genome, predicted proteome and metabolic pathways of the MLOs

Although it lives in anaerobic or microaerophilic conditions, *Blastocystis* sp. harbors MLOs that present both mitochondrial and hydrogenosomal features [24]. We recently reported that *Blastocystis* sp. MLOs contain a circular genome, including genes encoding 10 of the 20 complex I subunits, but they lack all genes encoding cytochromes, cytochrome oxidases and ATP synthase subunits [24], unlike mitochondrial DNA from other sequenced stramenopiles, such as *Phytophthora* sp. [48]. The MLO genome of the *Blastocystis* subtype 7 is a circular molecule 29,270 bp in size. Two other MLO genomes were then sequenced from isolates belonging to other subtypes [49]: a subtype 1, represented by *Blastocystis* Nand II, with a 27,719 bp genome; and a subtype 4, represented by *Blastocystis* DMP/02-328, with a 28,382 bp genome. In addition to sequence conservation, these three genomes have many similarities. Their A+T content is around 80%, their gene density is higher than 95% and all three encompass 45 genes: 27 ORFs, 16 tRNAs and 2 rRNA genes. The ORFs consist of NADH subunits, ribosomal proteins and proteins with no similarity in the databases. The synteny between the three MLO genomes is highly conserved: gene order is strictly the same among the three genomes [24,49].

Through the analysis of a *Blastocystis* EST database, Stechmann et al. [23] have identified 110 potential proteins associated with mitochondrial pathways, such as the oxidative phosphorylation chain, tricarboxylic acid (TCA) cycle, Fe/S cluster assembly, and amino acid and fatty acid metabolisms. Nonetheless, approximately half of these proteins have an incomplete amino terminus

due to EST data, making it difficult to confirm mitochondrial import by algorithms. To clarify the metabolic characteristics of these puzzling organelles, we used data from the whole genome sequence in order to establish the *in silico* proteome of *Blastocystis* MLOs. For this purpose, a computational approach based on two different prediction algorithms (MitoProt and MitoPred) for mitochondrial-import proteins was chosen (see Materials and methods for more details). This approach predicted 365 MLO proteins (Table S6 in Additional file 3) whereas Stechmann *et al.* [23] predicted only 110 proteins. Among these 365 proteins, 299 were predicted to have an amino-terminal extension involved in mitochondrial import, suggesting that an alternative system might exist for the 66 remaining proteins. Of the 299 proteins, 41 remain as 'hypothetical protein' with unknown function and 31 have no homologues in public databases, which raises the question of the existence of undiscovered metabolic processes within these intriguing organelles (Table S6 in Additional file 3). The other proteins are involved in classical mitochondrial core functions, such as oxidative phosphorylation, amino acid metabolism, fatty acid oxidation, iron-sulfur cluster assembly, and mitochondrial import system. Several proteins involved in the translocase of the outer mitochondrial membrane (TOM complex), the translocase of the inner membrane (TIM complex), and the presequence translocase-associated motor (PAM complex), which perform protein transport into the matrix, were identified. Interestingly, the two essential subunits of the mitochondrial processing peptidase heterodimer (MPP  $\alpha/\beta$ ), essential for the cleavage of the targeting peptide, were also found [50].

Our analyses revealed that MLOs probably have three ways to make acetyl-CoA from pyruvate, supported by the presence of the pyruvate dehydrogenase complex, pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and pyruvate:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (an amino-terminal pyruvate:ferredoxin oxidoreductase domain fused to a carboxy-terminal NADPH-cytochrome P450 reductase domain) (Figure 2). *Euglena gracilis* mitochondria include this feature, which provides adaptability to various oxygen levels [51], and this might be to a lesser extent the case for *Blastocystis* sp. We have also identified the 20 subunits of the *Blastocystis* sp. MLO complex I (ten are encoded by the MLO genome and ten by nuclear genes). The four nuclear-encoded subunits of the mitochondrial respiratory chain complex II were detected and this complex could function in two ways (via succinate dehydrogenase or fumarate reductase) [52]. We did not identify any genes encoding complexes III and IV subunits or ATP synthase. However, we have found components of the TCA cycle, which was shown to be involved with complex II (fumarate reductase) in fumarate respiration

in parasitic helminths [52]. Interestingly, we identified a gene encoding a terminal oxidase, called alternative oxidase (AOX), which could be the terminal electron acceptor of complexes I and II (Figure 2), allowing adaptation to oxygen stress and maintaining the NADH/NAD balance, as has been suggested for *Cryptosporidium parvum* [53,54]. These data raise questions about the electron acceptor when complex II has succinate dehydrogenase or fumarate reductase activity, the quinone used in this process and the role of the proton gradient.

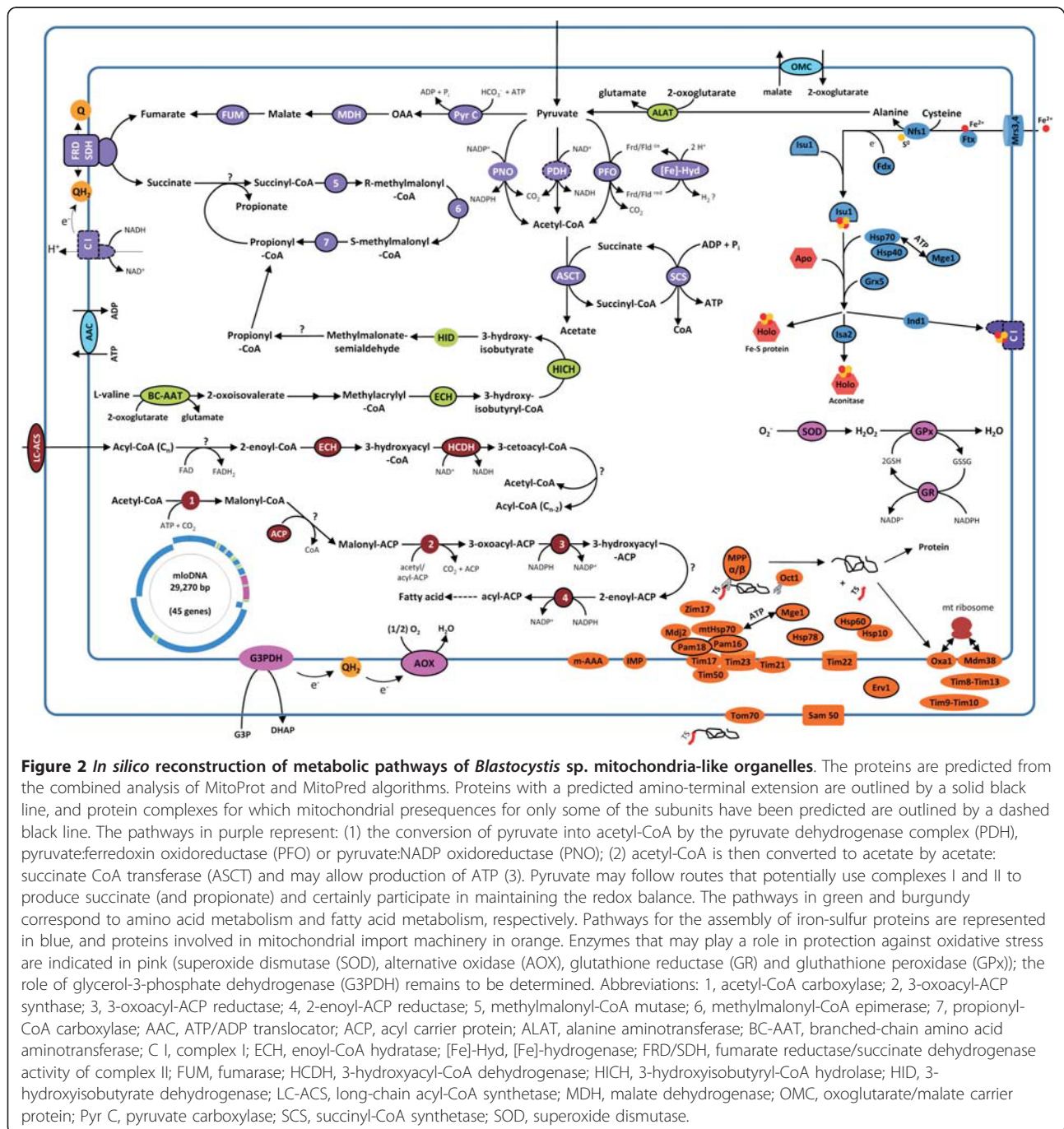
We also revealed proteins that can be grouped into essential mitochondrial pathways, like the Fe/S cluster assembly. More precisely, we have identified 11 enzymes (6 of which have predicted mitochondrial import signals), composing the iron-sulfur cluster system responsible for the assembly of mitochondrial Fe/S proteins [55], such as the cysteine desulfurase Nfs1, the scaffold protein Isu1, frataxin, and the P-loop NTPase Ind1, which is required for the assembly of complex I (Figure 2). We also highlighted some proteins involved in mitochondrial fatty acid synthesis type II [56], beta oxidation of fatty acids and amino acid metabolism (Table S6 in Additional file 3).

Taken together, our data confirm the mitochondrial nature of the *Blastocystis* sp. MLO. The oxygen-poor environment may have driven the selection of these unique organelles, which seemingly represent an intermediate situation between anaerobic mitochondria and hydrogenosomes, arguing for multiple situations arising during organelle evolution. It remains now to describe the metabolism occurring in these unusual organelles more precisely.

### Secretome and virulence factors

The persistence of *Blastocystis* sp. in the host may be due, to some extent, to its ability to override the response of the immune system and to adhere and survive within the intestinal tissue. Manipulation of the host might be facilitated by molecules released at the interface between the host and the parasite [57]. Accordingly, the study of the predicted secretome of *Blastocystis* sp. is of particular interest. With SIGNALP 3.0, 307 proteins were predicted to be secretory, of which 46 had no sequence similarity in the public nr databases. By sequence homology, 170 proteins that could play a role in host-parasite relationships were selected and submitted to PSORTII for extracellular location. Finally, 75 putative secreted proteins have been classified by putative functions, some of which may have a direct connection with pathogenicity (proteases, hexose digestion enzymes, lectins, glycosyltransferases and protease inhibitors; Table S4 in Additional file 2).

*Blastocystis* can secrete members of the immunophilin family, characterized by peptidyl-propyl *cis-trans*

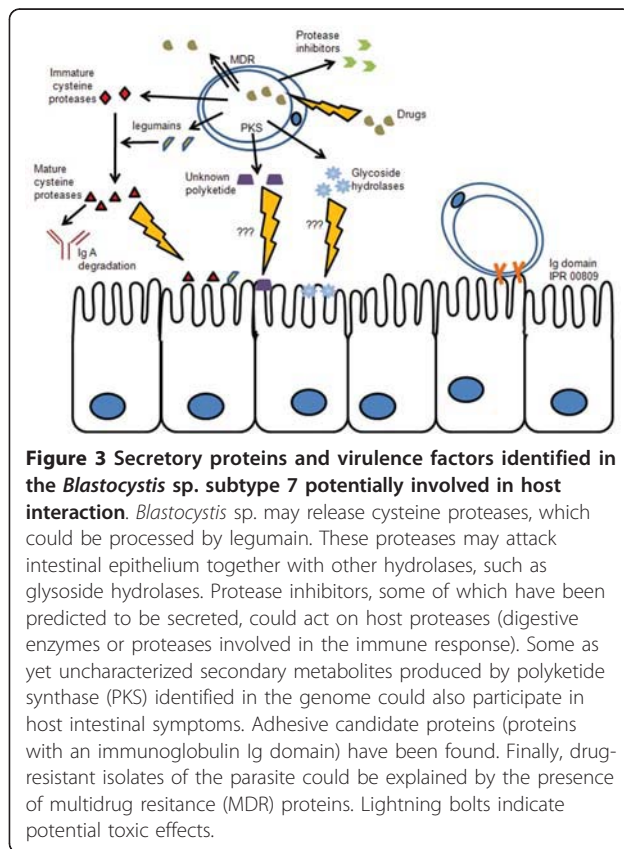


isomerase activity and disulfide isomerases (Figure 3; Table S4 in Additional file 2). These proteins have key roles in protein folding, but it has also been established that they can have moonlighting functions. In bacteria, they have evolved adhesive properties for the host [58] but they can also modulate host leukocyte function and induce cellular apoptosis [59]. A cyclophilin-like protein from the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* is directly involved in host-parasite crosstalk, as it can

modulate protective Th1 responses through its binding to the chemokine receptor CCR5 [60]. It is unclear what role these proteins play in *Blastocystis* sp., but this illustrates a range of functions for cell stress proteins in host-pathogen interactions.

Sugar-binding proteins have an important role through a conserved carbohydrate-recognition domain that could interact with host cell receptors. Such proteins have been characterized in other parasites [61] and





it is interesting to note that some sugar-binding proteins are able to inhibit Th1- and Th2-mediated inflammation [62,63]. Moreover, some specific sugar-binding proteins are also able to suppress regulatory T cells [64]. The binding of these proteins is dependent on their specific sugar motifs, which can be added to N- or O-linked glycans by glycosyltransferases. One carbohydrate-binding protein and eight glycosyltransferases (Table S4 in Additional file 2) have been predicted to be secreted. All these enzymes could allow cross-linking of *Blastocystis* sp. sugar-binding proteins to host cell receptors.

The parasite likely uses hydrolases to attack host tissues. Fucosidase, hexosaminidase and polygalacturonase have been identified in the predicted secretome and may participate in this process by degrading host glycoproteins (Figure 3; Table S4 in Additional file 2). Proteases have been proposed to be involved in diverse processes, such as host cell invasion, excystation, metabolism, cytoadherence or other virulence functions. A correlation between a high level of protease activity and the virulence of the intestinal parasite *E. histolytica* was proven by McKerrow et al. [65]. Indeed, cysteine proteases degrade extracellular matrix proteins, cleave immunoglobulin A and G, and are thought to be responsible for the cytopathic effect of different pathogens against *in vitro* cultured cells [66]. Interestingly, *Blastocystis* sp. proteolytic

enzymes are also able to degrade human secretory immunoglobulin A [67]. All the major classes of proteolytic enzymes were identified in the genome data, including serine, aspartic, and cysteine proteases and metalloproteases. Among the 66 proteases identified, 18 are predicted to be secreted by the parasite (Table S4 in Additional file 2). Within the protease family, cysteine protease-encoding genes are the most represented in *Blastocystis* sp. genome and 96% of the proteins encoded by these genes are predicted to be secreted. Among the cysteine proteases we have found five legumains and eight cathepsins; three cathepsins B contain the IPR015643 domain, which is only present in *Blastocystis* sp. compared to the other stramenopiles. The IPR015643 domain corresponds to the peptidase C1 cathepsin B domain and has a cysteine type peptidase activity, which was also found in pathogenic protozoa (*Leishmania* sp. and *Trypanosoma* sp.) [66]. Cysteine proteases are usually secreted in their inactive form and must be matured, having a prosegment that prevents hydrolysis during protease trafficking and storage. This maturation might result from the activity of the same protease or another, such as asparaginyl endopeptidase (also called legumain) [68]. This endopeptidase cleaves peptide bonds carboxy-terminal to asparagine residues, and may be involved in processing and activating both cathepsins L and B. Legumains have been predicted in the secretome of *Blastocystis* sp. (Table S4 in Additional file 2) and could be involved in protease processing (Figure 3). As an alternative role, secreted *Blastocystis* sp. legumains could also participate with other effectors in the alteration of the host intestine [69]. Indeed, it has been shown that legumain can degrade fibronectin, an extracellular matrix glycoprotein [70].

Genes coding for protease inhibitors are also present in the *Blastocystis* sp. genome, and some are predicted to be secreted. Release of protease inhibitors may weaken the host response as described in nematodes [71]. *Blastocystis* sp. encodes three protease inhibitors: cystatin, type1-proteinase inhibitor and endopeptidase inhibitor-like protein (Table S4 in Additional file 2). Type1-proteinase inhibitor is similar to chymotrypsin inhibitor, which is known to inactivate intestinal digestive enzymes (trypsin and chymotrypsin) as in *Ascaris suum* [72], thus protecting the parasite against non-specific digestive defenses. Cystatin, also called stefin, was described in *Fasciola gigantica* [73] and shown to inhibit mammalian cathepsin B, cathepsin L and other cysteine proteases, including parasite ones. In *Blastocystis* sp., secreted cystatin could participate in the regulation of parasitic cysteine protease activities. Cystatin can also potentially inhibit host proteases involved in MHC II antigen processing and presentation, including the key enzyme asparaginyl endopeptidase [74] and cathepsin S, the mammalian legumain [73].

Interestingly, a putative type I polyketide synthase (PKS) gene was also found in the *Blastocystis* sp. genome, potentially originating from HGT. PKS and non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) synthesize metabolites like simple fatty acids, but also a myriad of chemical structures that possess important pharmacological activities and environmental impact, such as toxins, antibiotics or antimicrobials. Type I PKS was formerly known only from bacteria and fungi, but recently homologous genes were also discovered in some protists [75]. According to the Database for NRPS and PKS [76], the *Blastocystis* sp. PKS gene possesses the three essential domains, and three other domains: dehydratase, ketoacyl reductase, and enoyl reductase domains. The presence of these additional domains would permit this organism to synthesize both reduced polyketides and fatty acids. Domain comparison with other type I PKSs suggests that *Blastocystis* sp. PKS is similar to type I PKS from the ascomycete *Cochliobolus heterostrophus*, a maize pathogen that produces T toxin [77], a polyketide molecule that disturbs mitochondria by binding a protein of the inner mitochondrial membrane. Searching polyketide-related metabolites in the secretome of *Blastocystis* sp. would be of interest in order to identify molecules that could have effects on the host (Figure 3).

#### Antioxidant system and multi drug resistance

Like other anaerobic organisms, *Blastocystis* sp. has to eliminate reactive oxygen species such as superoxide anions ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radicals ( $HO^{\cdot}$ ) resulting from metabolism. In addition, this microorganism has to cope with the oxidative burst imposed by host immune cell effectors (release of  $O_2^{\cdot-}$  subsequently processed to give additional reactive oxygen species). For these reasons, to protect against oxidative injury, *Blastocystis* species have developed an efficient battery of antioxidant enzymes (Table S5 in Additional file 2). The first lines of defense against oxygen damage are superoxide dismutases (SODs), a family of metalloproteins catalyzing the dismutation of  $O_2^{\cdot-}$  to form  $H_2O_2$  and oxygen. Genome annotation revealed the presence of two genes encoding SODs (SOD1 and SOD2) that exhibit sequence characteristics of dimeric iron-containing SODs [78] and likely protect the cytosol and MLOs, respectively, against  $O_2^{\cdot-}$ . Catalase and ascorbate peroxidase are subsequently able to remove  $H_2O_2$  generated by SODs as well as by NADPH-dependent oxidase. However, genes encoding catalase and ascorbate peroxidase have not been identified in *Blastocystis* sp. nor in many unicellular parasites, including trypanosomatids and *Plasmodium falciparum*. Additional enzymes, glutathione peroxidase (Gpx) and thioredoxin-dependent peroxidase (commonly known as peroxyredoxin (Prx)) are able to reduce  $H_2O_2$  to water

as well as other substrates, such as hydroperoxides and peroxynitrite. In most eukaryotes, both enzymes obtain their reducing equivalents from two redox systems, the glutathione (GSH) and the thioredoxin (Trx) systems, respectively. Like *P. falciparum* [79], *Blastocystis* sp. cells possess a complete GSH synthesis pathway: the genes encoding  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase, glutathione synthetase (eu-GS group) and a functional GSH/Gpx (nonselenium Gpx belonging to the PHGpx group)/glutathione reductase system have been identified and both Gpx and glutathione reductase are probably located in the MLO. This nearly ubiquitous redox cycle is replaced by the trypanothione system in trypanosomatids [80]. *Blastocystis* sp. also contains genes encoding the proteins of the Trx/thioredoxin reductase (TrxR)/Prx system. Indeed, two genes encode small proteins homologous to Trx: one cytosolic and another most likely located in the MLO (Table S5 in Additional file 2). Trx is itself reduced by TrxR and three genes encoding cytosolic TrxR have been identified in *Blastocystis* sp. These proteins clearly belong to the high molecular weight (designated H-TrxR) group of enzymes and are similar to metazoan enzymes, including those of *Homo sapiens* and *Drosophila melanogaster*, and to those of the apicomplexan protozoa *Plasmodium*, *Toxoplasma*, and *Cryptosporidium* [81]. Interestingly, in contrast to apicomplexan H-TrxRs, two of the H-TrxR enzymes of *Blastocystis* are predicted to possess a redox active center in the carboxy-terminal domain composed of a selenocysteine (a rare amino acid encoded by the opal codon TGA, which is not recognized as a stop codon) at the penultimate position and its neighboring cysteine residue as in metazoan enzymes (selenoprotein type H-TrxR). This strongly suggests the presence of the Se-Cys insertion machinery (SECIS elements) in *Blastocystis* sp. Genes encoding another type of TrxR with low molecular weight (designated L-TrxR) have been identified in parasitic protozoa such as *Trichomonas*, *Entamoeba*, and *Giardia* but not in the genome of *Blastocystis* sp. These data reinforce the assumption of the exclusive occurrence of either L-TrxR or H-TrxR in genomes and of some disadvantages of possessing both types of TrxR [81]. In *Blastocystis* sp., at least 11 highly similar gene copies encoding predicted cytosolic Prxs have been found that clearly belong to the typical 2-Cys class of Prx. Whether sequence polymorphism of these enzymes is potentially correlated with diversified expression or even function remains to be explored. Another gene encoding a typical 2-Cys Prx, likely located in the MLO, has been identified in this parasite. Interestingly, like the homologous sequence of another stramenopile, *P. infestans*, this latter protein is fused to Trx with a WCGKC motif. As described above, *Blastocystis* sp. possesses a whole array of antioxidant enzymes protecting both the cytosol and

MLO. As shown in Table S5 in Additional file 2, these enzymes have distinct phylogenetic origins and most of them probably originate from prokaryote HGT. These antioxidant proteins attract attention in unicellular parasites as they have important functions in host-parasite interactions and constitute new drug targets for the design of inhibitors. Indeed, genetic approaches have undoubtedly shown that some anti-oxidant enzymes are essential for the survival of different parasitic species [82-86].

Some genes coding for multi-drug resistance pump proteins have also been discovered in the *Blastocystis* sp. genome. There are two classes of multi-drug resistance genes: the first class corresponds to proteins that are energized by ATP hydrolysis; the second class includes proteins that mediate the drug efflux reaction with a proton or sodium ion gradient. Among the first class, 24 ABC transporter genes were found. In eukaryotes the main physiological function of ABC transporters is the export of endogenous metabolites and cytotoxic compounds [87] and eight families of ABC transporters (ABC A to H) have been identified. The *Blastocystis* sp. ABC transporters are included in four of these eight families (five in family A, six in family B, six in family C, three in family F, and four not in any class). The A family is involved in lipid trafficking, and the F family in DNA repair and gene regulation. The other two families are more interesting [87], since in protozoan parasites (*Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Plasmodium* spp.) transporters belonging to the B and C families confer resistance to drugs. Metronidazole-resistant strains of *Blastocystis* sp. could have arisen through the action of these multi-drug resistance proteins (Figure 3).

## Conclusions

We have provided the first genome sequence of a *Blastocystis* sp. subtype, which could serve in comparative genomics studies with other subtypes to provide clues to clarify how these protozoans develop pathogenicity in some humans. Analysis of this genome has revealed original traits of this lineage compared to other stramenopiles (free living and plant pathogens). Aerobic respiration has been lost, *Blastocystis* sp. instead having the MLO, an anaerobic organelle, which should advance our understanding of organelle evolution as the *Blastocystis* sp. MLO seems to be unique among organelles (Figure 2) but remains to be biochemically characterized. Some genes may have been gained through HGT, which may participate in essential functions for an intestinal parasite (adhesion, energy production). These genes probably have facilitated adaptation to intestinal environments. The *Blastocystis* sp. secretome has been predicted and this has permitted the identification of candidate proteins that could degrade host tissues in

order to provide nutrients. Putative secretory proteins that can interfere with non-specific and specific host defense systems have also been found, enabling *Blastocystis* sp. to survive within this hostile environment (Figure 3). These putative secretory proteins are of particular interest as they may interact directly with host tissue and could help in understanding the host-parasite interactions and could also be used as markers to distinguish between non-pathogenic and pathogenic isolates. If their functions are essential, they could also be used to develop future vaccine formulations. The antioxidant proteins offer interesting therapeutic targets as they might be important for the parasite in fighting oxidative bursts. In summary, the deciphering of the *Blastocystis* sp. genome will contribute to the study of interactions between this parasite and its host at a post-genomic scale and pave the way for deciphering the host-parasite interactome. Finally, the '*Blastocystis* sp. story' is reminiscent of the amoeba pathogenicity story where two morphologically indistinguishable species have different pathogenic potential [88], and this genome will help in the development of typing tools for the characterization of pathogenic isolates.

## Materials and methods

### Genome sequencing

The *Blastocystis* sp. genome was sequenced using a whole genome shotgun strategy. All data were generated by paired-end sequencing of cloned inserts using Sanger technology on ABI3730xl sequencers. Table S1 in Additional file 2 gives the number of reads obtained per library. All reads were assembled with Arachne [89]. We obtained 157 contigs that were linked into 54 supercontigs. The contig N50 was 297 kb, and the supercontig N50 was 901 kb (Table S2 in Additional file 2).

### Genome annotation

#### Construction of the training set

A set of 300 gene models from a preliminary annotation run was selected randomly, among those that were validated by *Blastocystis* sp. cDNAs (that is, with every intron confirmed by at least one cDNA and no exon overlapping a cDNA intron) to create a clean *Blastocystis* sp. training set. This training set was used to train gene prediction algorithms and optimize their parameters.

#### Repeat masking

Most of the genome comparisons were performed with repeat masked sequences. For this purpose, we searched and masked sequentially several kinds of repeats: known repeats and transposons available in Repbase with the Repeat Masker program [90], tandem repeats with the TRF program [91], *ab initio* repeat detection with RepeatScout [92], rDNA by BLATing [93] 189 rDNAs



sequences (downloaded from GenBank), and telomeric repeats by searching 'CCCTAA' patterns in the scaffolds with the BLAST2 algorithm.

#### **GeneWise**

The UniProt [94] database was used to detect conserved genes between *Blastocystis* sp. and other species. As GeneWise [95] is time greedy, the UniProt database was first aligned with the *Blastocystis* sp. genome assembly using BLAT [93]. Subsequently, we extracted the genomic regions where no protein hit had been found by BLAT and realigned Uniprot proteins with more permissive parameters. Each significant match was then refined using GeneWise in order to identify exon/intron boundaries.

#### **GeneID and SNAP**

GeneID [96] and SNAP [97]*ab initio* gene prediction software were trained on 300 genes from the training set.

#### **Blastocystis sp. cDNAs**

Full-length-enriched cDNA libraries were constructed from *Blastocystis* sp. vacuolar forms using a SV total RNA isolation system (Promega France, Charbonnières, France) for RNA extraction. RNA quality and quantity were estimated using the Agilent bioanalyser with the RNA 6000 Nano LabChip<sup>®</sup> Kit. The clones were sequenced on the 5' end, producing 34,470 useful reads. We were able to align 33,685 cDNA sequences to the *Blastocystis* sp. genome assembly with the following pipeline: after masking of polyA tails, the sequences were aligned with BLAT on the assembly and all matches with scores within 99% of the best score were extended by 5 kb on each end, and realigned with the cDNA clones using the EST2genome software [98].

#### **Stramenopile ESTs**

A collection of 410,069 public mRNAs from the stramenopile clade (276,208 downloaded from the National Center for Biotechnology Information plus 43,932 and 80,929 ESTs downloaded from the Joint Genome Institute for diatoms and *Ectocarpus*, respectively) were first aligned with the *Blastocystis* sp. genome assembly using BLAT [93]. To refine BLAT alignment, we used EST2genome [98]. Each significant match was chosen for an alignment with EST2genome. BLAT alignments were made using default parameters between translated genomic and translated ESTs.

#### **Integration of resources using GAZE**

All the resources described here were used to automatically build *Blastocystis* sp. gene models using GAZE [99]. Individual predictions from each of the programs (that is, GeneID, SNAP, GeneWise, EST2genome) were broken down into segments (coding, intron, intergenic) and signals (start codon, stop codon, splice acceptor, splice donor, transcript start, transcript stop).

Exons predicted by *ab initio* software (that is, GeneWise and EST2genome) were used as coding segments. Introns predicted by GeneWise and EST2genome were used as intron segments. Intergenic segments were created from the span of each mRNA using a negative score (coercing GAZE not to split genes). Predicted repeats were used as intron and intergenic segments to avoid prediction of genes coding proteins in such regions.

The whole genome was scanned to find signals (splice sites and start and stop codons). Additionally, transcript stop signals were extracted from the ends of mRNAs (polyA tail positions).

Each segment extracted from software output that predicts exon boundaries (like GeneWise, Exonerate or *ab initio* predictors) was used by GAZE only if GAZE chose the same boundaries. Each segment or signal from a given program was given a value reflecting our confidence in the data, and these values were used as scores for the arcs of the GAZE automaton. All signals were given a fixed score, but segment scores were context sensitive: coding segment scores were linked to the percentage identity of the alignment; intronic segment scores were linked to the percentage identity of the flanking exons. A weight was assigned to each resource to further reflect its reliability and accuracy in predicting gene models. This weight acts as a multiplier for the score of each information source, before processing by GAZE. When applied to the entire assembled sequence, GAZE predicted 4,798 gene models. Since the resource of expressed sequences in stramenopiles is limited, and some gene-free 'holes' appeared in gene-dense regions, we suspected that some genes had been missed by the annotation pipeline because of a lack of support.

#### **Additional gene models**

With the assumption that not all genes in *Blastocystis* sp. have EST support, we developed the following strategy to recuperate additional gene models. *Ab initio* (SNAP and GeneID) predictions that did not overlap GAZE gene models were selected and aligned to UniProt sequences. Predictions that had significant hits (coverage  $\geq 90\%$ ; e-value  $\leq 10^{-5}$ ) were tagged as potential coding genes and randomly chosen genes were successfully verified by RT-PCR using the Access RT-PCR system (Promega France, Charbonnières, France). The final proteome composed of 6,020 gene models was obtained by adding 1,222 supplementary models to the 4,798 genes from the first GAZE output.

#### **Identification of orthologous genes**

We identified orthologous genes with three species: *Cyandioschyzon merolae* [100], *P. sojae* [49] and *T. pseudonana* [101]. Each pair of predicted genes was aligned with the Smith-Waterman algorithm, and alignments with a score

higher than 300 (BLOSUM62, gapo = 10, gape = 1) were retained. Orthologs were defined as BRHs, that is, two genes, A from genome GA and B from genome GB, were considered orthologs if B is the best match for gene A in GB and A is the best match for B in GA.

#### Identification of paralogous genes and duplicated blocks

An all-against-all comparison of *Blastocystis* sp. proteins was performed using the Smith-Waterman algorithm implemented in the Biofacet package [102]. BRHs were identified as follows: two genes, A and B, are the BRH if B is the best match for gene A and A for gene B. The distribution of percentage identities among the pairs of BRHs is displayed in Figure S7 in Additional file 1. The distribution is widespread except for the abundant class of genes sharing  $\geq 90\%$  of identity, which represents 48% of all pairs of paralogs. We investigated this apparently recent gene duplication by selecting all pairs of genes sharing  $\geq 90\%$  identity over  $\geq 50\%$  of the length of the shortest protein (not only BRHs), which gave 1,917 gene pairs corresponding to 1,141 genes scattered in 404 gene families (19% of *Blastocystis* sp. genes). The number of counterparts per gene is displayed in Figure S2 in Additional file 1. Additionally, blocks of paralogous genes, or so-called duplicated blocks, were identified by clustering the 1,917 gene pairs. The clustering was performed by single linkage clustering using the Euclidian distance between genes, and independently of gene orientation. Those distances were calculated with the gene index on each scaffold rather than the genomic position, including only the genes with paralogs. The minimal distance between two paralogous genes was set to 5 and the minimal number of genes in a cluster was set to 4 (two pairs of paralogous genes; Figure S8 in Additional file 1).

#### Identification of candidate horizontal gene transfers

*Blastocystis* sp. proteins were blasted [103] (blastx) against the protein nr database with the parameters '-f 100 -X 100 -e 0.00001 -E 2 -W 5', and the best hits were retained using the following criteria: for BLAST scores greater than 200, all hits with a score greater than 90% of the best score were retained; and for BLAST scores lower or equal to 200, all hits with a score greater than 80% of the best score were retained. Then, the proteins with all their best hits in bacteria or archaea were retained as candidates that had potentially arisen from HGT. Other criteria for the blastx comparison were tested (such as W = 3) but we observed no significant difference in the results after the subsequent filters. Candidates with some of their best hits in stramenopiles in addition to bacteria were also retained since some HGTs may be shared between stramenopiles, and genes for which orthologs were identified in non-stramenopile

species were discarded. The evolutionary origin of the candidate genes was then investigated using phylogenetic approaches (Figure S6 in Additional file 1). For each gene, homologues were retrieved from the protein nr database using Blastp (default parameters, except for the max-target-sequences threshold, which was fixed at 500). The sequences were aligned using Muscle 3.6 [104] (default parameters). The resulting alignments were visually inspected and manually refined using the MUST software [105]. Ambiguously aligned regions were removed prior to phylogenetic analysis.

Maximum likelihood phylogenetic tree reconstructions were carried out on the remaining positions using PhyML [106] with the Le and Gascuel (LG) model [106] with a gamma correction (four discrete classes, an estimated alpha parameter) to take into account evolutionary rate variation among sites. Tree robustness was estimated by a non-parametric bootstrap approach using PhyML and the same parameters with 100 replicates of the original dataset. Bayesian phylogenetic trees were also reconstructed using MrBayes version 3.1.2 [107]. We used a mixed model of amino acid substitution and a gamma distribution (four discrete categories plus a proportion of invariant sites) to take into account site rate variation. MrBayes was run with four chains for 1 million generations and trees were sampled every 100 generations. To construct the consensus tree, the first 1,500 trees were discarded as 'burn-in'. The candidates with clear eukaryotic origin were then discarded. This process provided 133 candidate genes (Table S3 in Additional file 2). These candidates contain a high proportion of monoexonic genes (39%) compared to the average number of monoexonic genes in *Blastocystis* sp. (approximately 15%).

#### Protein domain analysis

InterProScan [108] was run against all *C. merolae*, *P. sojae*, *T. pseudonana* and *Blastocystis* sp. proteins. Matches that fulfilled the following criteria were retained: match tagged as 'true positive' by InterProScan (status = T); match with an e-value  $\leq 10^{-1}$ . A total of 2,305 InterPro domains (with IPR number) were found in *Blastocystis* sp., which corresponds to 4,096 proteins.

#### Functional annotation

##### Enzyme annotation

Enzyme detection in predicted *Blastocystis* sp. proteins was performed with PRIAM [109], using the PRIAM July 2006 Enzyme release. A total of 428 different EC numbers, corresponding to enzyme domains, are associated with 1,140 *Blastocystis* sp. proteins. Therefore, about 19% of *Blastocystis* sp. proteins contain at least one enzymatic domain.

### Association of metabolic pathways with enzymes and *Blastocystis* sp

Potential metabolic pathways were deduced from EC numbers using the KEGG pathway database [110]. Links between EC numbers and metabolic pathways were obtained from the KEGG website. Using this file and the PRIAM results, 906 (of the 1,140) *Blastocystis* sp. proteins were assigned to 201 pathways.

### Identification of putative proteins imported within the MLOs

The whole proteome was scanned by two algorithms aimed at predicting proteins imported to mitochondria; MitoProt [111], which predicts mitochondrial-targeting sequences, and MitoPred [112], which predicts nuclear-encoded mitochondrial proteins based on Pfam domains (animal/yeast database). After manual processing and using a script, only protein sequences with a score above 0.5 and 85% for MitoProt and MitoPred, respectively, were selected. This output file was then used in a KEGG Automatic Annotation Server (KAAS) with the bi-directional best hit method [113] in order to automatically generate KEGG pathways. Because protein domain annotations did not always provide sufficient information (PRIAM July 2006 Enzyme release), a BLAST comparison against the non-redundant database was conducted.

### Secretome prediction using SignalP 3.0 and pSORTII

Prediction of secreted proteins is based on the analysis of amino-terminal secretory signal sequences (SignalP 3.0) followed by the selection of proteins predicted as extracellular by pSORTII. Each of the proteins was individually submitted to SignalP 3.0 for analysis with the following parameters: organism set to eukaryotes, output short format and protein sequence truncation after the first 50 amino acids. Results of SignalP 3.0 were exported to a temporary file, and identification of signal peptides was accomplished by parsing the results of the hidden Markov model analysis conducted by SignalP 3.0. Proteins with secretory signals were retained and analyzed on the basis of possible function in host-parasite interactions. These last ones were also analyzed using PSORT II [114], and those having a best hit as 'extracellular' were selected. The SignalP threshold value for secretory signal peptide prediction was set at 0.5 as determined for previous analyses [115] and the best hit was chosen for the PSORTII analysis. The predicted secretory proteins were then annotated as functional protein families.

### Additional material

**Additional file 1: Genome organization of *Blastocystis* sp. (introns, numbers of counterparts per gene, genome structure, and so on) and phylogenetic trees illustrating horizontal gene transfer events from prokaryotic donors to *Blastocystis* sp. and candidate genes for endosymbiotic gene transfers of chloroplastic origin.**

**Additional file 2: Sequencing overview and assembly metric data, and the identification of horizontal gene transfer, secretory protein and antioxidant protein candidates.**

**Additional file 3: Proteins putatively imported in the mitochondria-like organelle.**

### Abbreviations

bp: base pair; BRH: best reciprocal hit; EST: expressed sequence tag; Gpx: glutathione peroxidase; GSH: glutathione; HGT: horizontal gene transfer; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; MFS: major facilitator transporter; MLO: mitochondria-like organelle; NRPS: non-ribosomal peptide synthase; ORF: open reading frame; PKS: polyketide synthase; Prx: peroxiredoxin; SOD: superoxide dismutase; TCA: tricarboxylic acid; Trx: thioredoxin; TrxR: thioredoxin reductase; WGD: whole genome duplication.

### Acknowledgements

We would like to thank François Enault (Université Blaise Pascal) for SignalP 3.0 analysis, David G Biron (Université Blaise Pascal) and Susan Cure (Genoscope, Evry) for manuscript reading, comments and English corrections.

### Author details

<sup>1</sup>Genoscope (CEA) and CNRS UMR 8030, Université d'Evry, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France. <sup>2</sup>Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>3</sup>CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63177 Aubière, France. <sup>4</sup>Center for Infection and Immunity of Lille, Institut Pasteur de Lille, F-59019 Lille Cedex, France. <sup>5</sup>Inserm U1019, F-59000 Lille Cedex, France. <sup>6</sup>CNRS UMR 8402, F-59021 Lille Cedex, France. <sup>7</sup>University Lille-Nord de France, F-59000 Lille Cedex, France. <sup>8</sup>Laboratoire de chimie bactérienne (CNRS UPR9043), Institut de Microbiologie de la Méditerranée, 31 chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille, France. <sup>9</sup>Université de Provence, Aix-Marseille I, 3 place Victor Hugo, 13331 Marseille, France. <sup>10</sup>Laboratory of Molecular and Cellular Parasitology, Department of Microbiology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore, 5 Science Drive 2, 117597 Singapore.

### Authors' contributions

FDen, PW, CPV and HEA conceived and designed the experiments. MR, IW, JP, GCN, BS, BN, CDS, AC and HEA performed the experiments. MR, IW, MD, CT, BN, EV, CBA, FDen, VA, FA, JMA, OJ, KSWT, FDel, PW and HEA analyzed the data. FDen, MR, IW, EV, CBA, FDel, CPV and HEA wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 25 October 2010 Revised: 4 January 2011

Accepted: 25 March 2011 Published: 25 March 2011

### References

1. Tan KS: New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008, **21**:639-665.
2. Alexieff A: Sur la nature des formations dites "kystes de *Trichomonas intestinalis*". *CR Soc Biol* 1911, **71**:296-298.
3. Silberman JD, Sogin ML, Leippe DD, Clark CG: Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 1996, **380**:398.
4. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, Yano TA, Hasegawa M: Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *J Eukaryot Microbiol* 2002, **49**:42-53.
5. Hoevers JD, Snowden KF: Analysis of the ITS region and partial ssu and lsu rRNA genes of *Blastocystis* and *Proteromonas lacertae*. *Parasitology* 2005, **131**:187-196.
6. Patterson DJ: The diversity of eukaryotes. *Am Nat* 1999, **154**:S96-S124.
7. Brumpt E: *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines. *Bull Soc Pathol Exot* 1912, **5**:725-730.



8. Windsor JJ, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, Jones SK, Whiteside TM: **Incidence of *Blastocystis hominis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis.** *Br J Biomed Sci* 2002, **59**:154-157.
9. Stark D, van Hal S, Marriott D, Ellis J, Harkness J: **Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis.** *Int J Parasitol* 2007, **37**:11-20.
10. Rivera WL: **Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines.** *Vet Parasitol* 2008, **156**:178-182.
11. Souppart L, Moussa H, Clian A, Sancier G, Poirier P, El Alaoui H, Delbac F, Boorom K, Delhaes L, Dei-Cas E, Viscogliosi E: **Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt.** *Parasitol Res* 2010, **106**:505-511.
12. Marciano MG, Takizawa H, Falavigna DLM, Gomes ML: **Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Paraná, southern Brazil.** *Rev Inst Med trop S Paulo* 2009, **51**:31-35.
13. Souppart L, Sancier G, Clian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, Dei-Cas E, Boorom K, Delhaes L, Viscogliosi E: **Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France.** *Parasitol Res* 2009, **105**:413-421.
14. Cironi O, Giacometti A, Drenaggi D, Ancarani F, Scalise G: **Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts.** *Eur J Epidemiol* 1999, **15**:389-393.
15. Lucia JF, Aguilar C, Betran A: ***Blastocystis hominis* colitis in a haemophilic patient as a cause of lower gastrointestinal bleeding.** *Haemophilia* 2007, **13**:224-225.
16. Stenzel DJ, Boreham PF: ***Blastocystis hominis* revisited.** *Clin Microbiol Rev* 1996, **9**:563-584.
17. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG: **Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus.** *Trends Parasitol* 2007, **23**:93-96.
18. Wong KH, Ng GC, Lin RT, Yoshikawa H, Taylor MB, Tan KS: **Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore.** *Parasitol Res* 2008, **102**:663-670.
19. Iguchi A, Ebisu A, Nagata S, Saitou Y, Yoshikawa H, Iwatani S, Kimata I: **Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats.** *Parasitol Int* 2007, **56**:107-112.
20. Boorom KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, Li LH, Zhou XN, Ok UZ, Leelayoova S, Jones MS: **Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection.** *Parasit Vectors* 2008, **1**:40.
21. Zierdt CH: ***Blastocystis hominis*-past and future.** *Clin Microbiol Rev* 1991, **4**:61-79.
22. Nasirudeen AMA, Eu-Hian Y, Singh M, Tan KSW: **Metronidazole induces programmed cell death in the protozoan parasite *Blastocystis hominis*.** *Microbiology* 2004, **150**:33-43.
23. Stechmann A, Hamblin K, Perez-Brocal V, Gaston D, Richmond GS, van der Giezen M, Clark CG, Roger AJ: **Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes.** *Curr Biol* 2008, **18**:580-585.
24. Wawrzyniak I, Roussel M, Diogon M, Couloux A, Texier C, Tan KS, Vivares CP, Delbac F, Wincker P, El Alaoui H: **Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis hominis*.** *Int J Parasitol* 2008, **38**:1377-1382.
25. Windsor JJ: ***Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis*: neglected human protozoa.** *The Biomedical Scientist* 2007, **64**:524-527.
26. al-Tawil YS, Gilger MA, Gopalakrishna GS, Langston C, Bommer KE: **Invasive *Blastocystis hominis* infection in a child.** *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994, **148**:882-885.
27. Jaillon O, Aury JM, Brunet F, Petit JL, Stange-Thomann N, Mauceli E, Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz C, Bernot A, Nicaud S, Jaffe D, Fisher S, Lutfalla G, Dossat C, Segurens B, Dasilva C, Salanoubat M, Levy M, Boudet N, Castellano S, Anthouard V, Jubin C, Castelli V, Katinka M, Vacherie B, Biémont C, Skalli Z, Cattolico L, Poulain J, et al: **Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype.** *Nature* 2004, **431**:946-957.
28. Davis JC, Petrov DA: **Preferential duplication of conserved proteins in eukaryotic genomes.** *PLoS Biol* 2004, **2**:E55.
29. Wolfe KH, Shields DC: **Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome.** *Nature* 1997, **387**:708-713.
30. Semple C, Wolfe KH: **Gene duplication and gene conversion in the *Caenorhabditis elegans* genome.** *J Mol Evol* 1999, **48**:555-564.
31. Vision TJ, Brown DG, Tanksley SD: **The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*.** *Science* 2000, **290**:2114-2117.
32. Sankoff D: **Gene and genome duplication.** *Curr Opin Genet Dev* 2001, **11**:681-684.
33. Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE: **Recent segmental duplications in the human genome.** *Science* 2002, **297**:1003-1007.
34. Wolfe KH, Li WH: **Molecular evolution meets the genomics revolution.** *Nat Genet* 2003, **33**(Suppl):255-265.
35. Andersson JO, Roger AJ: **A cyanobacterial gene in nonphotosynthetic protists - an early chloroplast acquisition in eukaryotes?.** *Curr Biol* 2002, **12**:115-119.
36. Maruyama S, Misawa K, Iseki M, Watanabe M, Nozaki H: **Origins of a cyanobacterial 6-phosphogluconate dehydrogenase in plastid-lacking eukaryotes.** *BMC Evol Biol* 2008, **8**:151.
37. Archibald JM: **The puzzle of plastid evolution.** *Curr Biol* 2009, **19**:R81-88.
38. Keeling PJ, Palmer JD: **Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution.** *Nat Rev Genet* 2008, **9**:605-618.
39. Andersson JO: **Horizontal gene transfer between microbial eukaryotes.** *Methods Mol Biol* 2009, **532**:473-487.
40. Keeling PJ: **Functional and ecological impacts of horizontal gene transfer in eukaryotes.** *Curr Opin Genet Dev* 2009, **19**:613-619.
41. Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, O'tillar RP, Rayko E, Salamov A, Vandepoele K, Beszteri B, Gruber A, Heijde M, Katinka M, Mock T, Valentin K, Verret F, Berges JA, Brownlee C, Cadoret JP, Chiovitti A, Choi CJ, Coesel S, De Martino A, Detter JC, Durkin C, Falciatore A, et al: **The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes.** *Nature* 2008, **456**:239-244.
42. Richards TA, Dacks JB, Jenkinson JM, Thornton CR, Talbot NJ: **Evolution of filamentous plant pathogens: gene exchange across eukaryotic kingdoms.** *Curr Biol* 2006, **16**:1857-1864.
43. Law CJ, Maloney PC, Wang DN: **Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters.** *Annu Rev Microbiol* 2008, **62**:289-305.
44. Berger P, Papazian L, Drancourt M, La Scola B, Auffray JP, Raoult D: **Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**:248-255.
45. Embley TM, van der Giezen M, Horner DS, Dyal PL, Foster P: **Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003, **358**:191-201, discussion 201-192.
46. Field J, Rosenthal B, Samuelson J: **Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-CoA synthetase and alcohol dehydrogenases from anaerobic prokaryotes to *Entamoeba histolytica*.** *Mol Microbiol* 2000, **38**:446-455.
47. Nixon JE, Wang A, Field J, Morrison HG, McArthur AG, Sogin ML, Loftus BJ, Samuelson J: **Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, NADH oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*.** *Eukaryot Cell* 2002, **1**:181-190.
48. Martin FN, Bensasson D, Tyler BM, Boore JL: **Mitochondrial genome sequences and comparative genomics of *Phytophthora ramorum* and *P. sojae*.** *Curr Genet* 2007, **51**:285-296.
49. Perez-Brocal V, Clark CG: **Analysis of two genomes from the mitochondrion-like organelle of the intestinal parasite *Blastocystis*: complete sequences, gene content, and genome organization.** *Mol Biol Evol* 2008, **25**:2475-2482.
50. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N: **Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms.** *Cell* 2009, **138**:628-644.
51. Hoffmeister M, van der Klei A, Rotte C, van Grinsven KW, van Hellemond JJ, Henze K, Tielens AG, Martin W: ***Euglena gracilis* rhodoquinone:ubiquinone ratio and mitochondrial proteome differ under aerobic and anaerobic conditions.** *J Biol Chem* 2004, **279**:22422-22429.
52. Tielens AG, Rotte C, van Hellemond JJ, Martin W: **Mitochondria as we don't know them.** *Trends Biochem Sci* 2002, **27**:564-572.
53. Putignani L, Tait A, Smith HV, Horner D, Tovar J, Tetley L, Wastling JM: **Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*.** *Parasitology* 2004, **129**:1-18.
54. Henriquez FL, Richards TA, Roberts F, McLeod R, Roberts CW: **The unusual mitochondrial compartment of *Cryptosporidium parvum*.** *Trends Parasitol* 2005, **21**:68-74.

55. Lill R: **Function and biogenesis of iron-sulphur proteins.** *Nature* 2009, **460**:831-838.
56. Hiltunen JK, Schonauer MS, Autio KJ, Mittelmeier TM, Kastaniotis AJ, Dieckmann CL: **Mitochondrial fatty acid synthesis type II: more than just fatty acids.** *J Biol Chem* 2009, **284**:9011-9015.
57. Corrales RM, Sereno D, Mathieu-Daude F: **Deciphering the *Leishmania* exoproteome: what we know and what we can learn.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010, **58**:27-38.
58. Bell A, Monaghan P, Page AP: **Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (immunophilins) and their roles in parasite biochemistry, host-parasite interaction and antiparasitic drug action.** *Int J Parasitol* 2006, **36**:261-276.
59. Henderson B: **Cell stress proteins as modulators of bacteria - host interactions.** *Novartis Found Symp* 2008, **291**:141-154, discussion 154-149, 221-144.
60. Golding H, Aliberti J, King LR, Manischewitz J, Andersen J, Valenzuela J, Landau NR, Sher A: **Inhibition of HIV-1 infection by a CCR5-binding cyclophilin from *Toxoplasma gondii*.** *Blood* 2003, **102**:3280-3286.
61. Klion AD, Donelson JE: **OvGalBP, a filarial antigen with homology to vertebrate galactoside-binding proteins.** *Mol Biochem Parasitol* 1994, **65**:305-315.
62. Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM, Bianco GA, Liberman A, Serra HM, Hirabayashi J, Rizzo LV, Rabinovich GA: **Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses.** *J Immunol* 2006, **176**:6323-6332.
63. Katoh S, Ishii N, Nobumoto A, Takeshita K, Dai SY, Shinonaga R, Niki T, Nishi N, Tominaga A, Yamauchi A, Hirashima M: **Galectin-9 inhibits CD44-hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **176**:27-35.
64. Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, Richter C, Weingarten P, Warger T, Knop J, Müllner S, Wijdenes J, Schild H, Schmitt E, Jonuleit H: **Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function.** *Blood* 2007, **110**:1550-1558.
65. McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J: **The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa.** *Annu Rev Microbiol* 1993, **47**:821-853.
66. Klemba M, Goldberg DE: **Biological roles of proteases in parasitic protozoa.** *Annu Rev Biochem* 2002, **71**:275-305.
67. Puthia MK, Vaithilingam A, Lu J, Tan KS: **Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*.** *Parasitol Res* 2005, **97**:386-389.
68. Dalton JP, Brindley PJ, Donnelly S, Robinson MW: **The enigmatic asparaginyl endopeptidase of helminth parasites.** *Trends Parasitol* 2009, **25**:59-61.
69. Wu B, Yin J, Texier C, Roussel M, Tan KS: ***Blastocystis* legumain is localized on the cell surface, and specific inhibition of its activity implicates a pro-survival role for the enzyme.** *J Biol Chem* 2010, **285**:1790-1798.
70. Morita Y, Araki H, Sugimoto T, Takeuchi K, Yamane T, Maeda T, Yamamoto Y, Nishi K, Asano M, Shirahama-Noda K, Nishimura M, Uzu T, Hara-Nishimura I, Koya D, Kashiwagi A, Ohkubo I: **Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells.** *FEBS Lett* 2007, **581**:1417-1424.
71. Hartmann S, Lucius R: **Modulation of host immune responses by nematode cystatins.** *Int J Parasitol* 2003, **33**:1291-1302.
72. Martzen MR, Peanasky RJ: ***Ascaris suum*: biosynthesis and iso-inhibitor profile of chymotrypsin/elastase iso-inhibitors.** *Exp Parasitol* 1985, **59**:313-320.
73. Tarasuk M, Vichasri Grams S, Vyanant V, Grams R: **Type I cystatin (stefin) is a major component of *Fasciola gigantica* excretion/secretion product.** *Mol Biochem Parasitol* 2009, **167**:60-71.
74. Manoury B, Gregory WF, Maizels RM, Watts C: **Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing.** *Curr Biol* 2001, **11**:447-451.
75. Smith S, Tsai SC: **The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases.** *Nat Prod Rep* 2007, **24**:1041-1072.
76. Database for NRPS and PKS. [http://www.nii.res.in/searchall.html].
77. Yang G, Rose MS, Turgeon BG, Yoder OC: **A polyketide synthase is required for fungal virulence and production of the polyketide T-toxin.** *Plant Cell* 1996, **8**:2139-2150.
78. Wintjens R, Noel C, May AC, Gerbod D, Dufernez F, Capron M, Viscogliosi E, Rooman M: **Specificity and phenetic relationships of iron- and manganese-containing superoxide dismutases on the basis of structure and sequence comparisons.** *J Biol Chem* 2004, **279**:9248-9254.
79. Muller S: **Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Mol Microbiol* 2004, **53**:1291-1305.
80. Muller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL: **Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites.** *Trends Parasitol* 2003, **19**:320-328.
81. Hirt RP, Muller S, Embley TM, Coombs GH: **The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives.** *Trends Parasitol* 2002, **18**:302-308.
82. Krnajska Z, Gilberger TW, Walter RD, Cowman AF, Muller S: **Thioredoxin reductase is essential for the survival of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages.** *J Biol Chem* 2002, **277**:25970-25975.
83. Krieger S, Schwarz W, Ariyanayagam MR, Fairlamb AH, Krauth-Siegel RL, Clayton C: **Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress.** *Mol Microbiol* 2000, **35**:542-552.
84. Plewes KA, Barr SD, Gedamu L: **Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival.** *Infect Immun* 2003, **71**:5910-5920.
85. Wilkinson SR, Horn D, Prathalingam SR, Kelly JM: **RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the african trypanosome.** *J Biol Chem* 2003, **278**:31640-31646.
86. Piacenza L, Alvarez MN, Peluffo G, Radi R: **Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection.** *Curr Opin Microbiol* 2009, **12**:415-421.
87. Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S, Villena I: **The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites.** *Mol Biochem Parasitol* 2009, **167**:81-94.
88. Pinilla AE, Lopez MC, Viasus DF: **[History of the *Entamoeba histolytica* protozoan].** *Rev Med Chil* 2008, **136**:118-124.
89. Jaffe DB, Butler J, Gnerre S, Mauceli E, Lindblad-Toh K, Mesirov JP, Zody MC, Lander ES: **Whole-genome sequence assembly for mammalian genomes: Arachne 2.** *Genome Res* 2003, **13**:91-96.
90. Chen N: **Using RepeatMasker to identify repetitive elements in genomic sequences.** *Curr Protoc Bioinformatics* 2004, **Chapter 4**, Unit 4 10.
91. Benson G: **Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**:573-580.
92. Price AL, Jones NC, Pevzner PA: **De novo identification of repeat families in large genomes.** *Bioinformatics* 2005, **21**(Suppl 1):i351-358.
93. Kent WJ: **BLAT - the BLAST-like alignment tool.** *Genome Res* 2002, **12**:656-664.
94. Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang H, Lopez R, Magrane M, Martin MJ, Natale DA, O'Donovan C, Redaschi N, Yeh LS: **The Universal Protein Resource (UniProt).** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:D154-159.
95. Birney E, Durbin R: **Using GeneWise in the *Drosophila* annotation experiment.** *Genome Res* 2000, **10**:547-548.
96. Parra G, Blanco E, Guigo R: **GenelD in *Drosophila*.** *Genome Res* 2000, **10**:511-515.
97. Korf I: **Gene finding in novel genomes.** *BMC Bioinformatics* 2004, **5**:59.
98. Mott R: **EST\_GENOME: a program to align spliced DNA sequences to unspliced genomic DNA.** *Comput Appl Biosci* 1997, **13**:477-478.
99. Howe KL, Chothia T, Durbin R: **GAZE: a generic framework for the integration of gene-prediction data by dynamic programming.** *Genome Res* 2002, **12**:1418-1427.
100. Nozaki H, Takano H, Misumi O, Terasawa K, Matsuzaki M, Maruyama S, Nishida K, Yagisawa F, Yoshida Y, Fujiwara T, Takio S, Tamura K, Chung SJ, Nakamura S, Kuroiwa H, Tanaka K, Sato N, Kuroiwa T: **A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*.** *BMC Biol* 2007, **5**:28.
101. Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov V, Kröger N, Lau WW, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, et al: **The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism.** *Science* 2004, **306**:79-86.
102. GenomeQuest. [http://www.gene-it.com].
103. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: **Basic local alignment search tool.** *J Mol Biol* 1990, **215**:403-410.



104. Edgar RC: **MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity.** *BMC Bioinformatics* 2004, **5**:113.
105. Philippe H: **MUST, a computer package of Management Utilities for Sequences and Trees.** *Nucleic Acids Res* 1993, **21**:5264-5272.
106. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O: **New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0.** *Syst Biol* 2010, **59**:307-321.
107. Ronquist F, Huelsenbeck JP: **MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.** *Bioinformatics* 2003, **19**:1572-1574.
108. Zdobnov EM, Apweiler R: **InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro.** *Bioinformatics* 2001, **17**:847-848.
109. Claudel-Renard C, Chevalet C, Faraut T, Kahn D: **Enzyme-specific profiles for genome annotation: PRIAM.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:6633-6639.
110. Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Nakaya A: **The KEGG databases at GenomeNet.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:42-46.
111. MITOPROT. [<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>].
112. MITOPRED. [<http://bioapps.rit.albany.edu/MITOPRED/>].
113. KEGG Automatic Annotation Server. [[http://www.genome.jp/kaas-bin/kaas\\_main](http://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main)].
114. PSORT II Prediction. [<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>].
115. Nagaraj SH, Gasser RB, Ranganathan S: **Needles in the EST haystack: large-scale identification and analysis of excretory-secretory (ES) proteins in parasitic nematodes using expressed sequence tags (ESTs).** *PLoS Negl Trop Dis* 2008, **2**:e301.

doi:10.1186/gb-2011-12-3-r29

**Cite this article as:** Denoeud *et al.*: Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biology* 2011 **12**:R29.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## II. Article 2 – Séquence complète du génome circulaire du MLO de *Blastocystis* sp. ST7

Durant l'étape d'assemblage du génome, nous nous sommes aperçus que deux contigs, présentant un A/T % beaucoup plus important que celui rencontré dans le reste du génome (80% versus 49%), étaient capables de former une molécule d'ADN circulaire, d'une taille de 29,27 kpb. L'annotation de cette molécule d'ADN a révélé que celle-ci codait pour des gènes typiquement mitochondriaux, impliqués dans la machinerie de traduction, et certaines sous-unités du complexe I de la chaîne respiratoire. Néanmoins, à la différence des génomes mitochondriaux d'autres straménopiles comme *Phytophthora* sp., ce génome circulaire que nous qualifions de génome mitochondrial, ne possède aucun gène codant pour les complexes III (Cob), IV (Cox1, Cox2, Cox3) et pour l'ATP synthase (Atp1, Atp6, Atp8, Atp9). Il est intéressant de noter que cette caractéristique est également retrouvée dans le génome des hydrogénosomes du cilié anaérobie *Nyctotherus ovalis* (de Graaf *et al.*, 2011).

Il apparaît donc que les MLOs de *Blastocystis* sp. présentent non seulement une morphologie mitochondriale (organites à double membrane présentant des crêtes), mais renferment également un génome typiquement mitochondrial, dont la localisation a été confirmée par hybridation *in situ* en microscopie électronique à transmission. L'ensemble de ces résultats, couplé à la localisation d'enzymes caractéristiques des hydrogénosomes telles que la Pyruvate:Ferrédoxine Oxydoréductase (PFOR) ou l'hydrogénase à fer au sein de la matrice de ces organites, rendent compte du caractère intermédiaire des MLOs, dont le métabolisme s'est adapté aux conditions d'anoxie de l'environnement intestinal.



## Rapid Communication

Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles  
of *Blastocystis hominis*Ivan Wawrzyniak<sup>a,1</sup>, Michaël Roussel<sup>a,1</sup>, Marie Diogon<sup>a</sup>, Arnaud Couloux<sup>b</sup>,  
Catherine Texier<sup>a</sup>, Kevin S.W. Tan<sup>c</sup>, Christian P. Vivarès<sup>a</sup>, Frédéric Delbac<sup>a</sup>,  
Patrick Wincker<sup>b</sup>, Hicham El Alaoui<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, France<sup>b</sup> Genoscope (CEA) and CNRS UMR 8030, Université d'Evry, 2 rue Gaston Crémieux CP5706, 91057 Evry, France<sup>c</sup> Laboratory of Molecular and Cellular Parasitology, Department of Microbiology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, 5 Science Drive 2, 117597, Singapore

Received 23 April 2008; received in revised form 16 June 2008; accepted 17 June 2008

## Abstract

*Blastocystis hominis* is an anaerobic parasite of the human intestinal tract belonging to the Stramenopile group. Using genome sequencing project data, we describe here the complete sequence of a 29,270-bp circular DNA molecule that presents mitochondrial features (such as oxidative phosphorylation complex I subunits) but lacks complexes III, IV and V. Transmission electron microscopy analyses reveal that this molecule, as well as mitochondrial (NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit 7 (NAD7),  $\beta$ -succinyl-CoA synthetase ( $\beta$ -SCS)) and hydrogenosomal (pyruvate ferredoxin oxido-reductase (PFOR), iron-hydrogenase) proteins, are located within double-membrane surrounded-compartments known as mitochondria-like organelles (MLOs). As there is no evidence for hydrogen production by this organism, we suggest that MLOs are more likely anaerobic mitochondria.

© 2008 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Blastocystis hominis*; MLOs; Circular DNA molecule; Iron-hydrogenase

Stramenopiles (Patterson, 1999) constitute a highly diverse group that includes free photosynthetic organisms such as diatoms, as well as non-photosynthetic taxa such as plant (*Phytophthora* spp.) and animal (*Blastocystis* spp.) parasites. They can live either in aerobic or in anaerobic conditions depending on their habitat (parasitic, freshwater, marine or terrestrial). *Blastocystis hominis* is a common anaerobic protozoan parasite found in the intestinal tract of humans and animals, that has recently been suggested to be involved in Irritable Bowel Syndrome (Stark et al., 2007). It harbours double-membrane surrounded-organelles of about 1  $\mu$ m, named “mitochondria-like organelles” (MLOs) (Nasirudeen and Tan, 2004), but their role and nature remain unclear. Most of

the microorganisms that live in different microaerophilic or anaerobic environments (e.g. protists, fungi and parasitic helminths), lack classical mitochondria but possess mitochondria-related organelles known as anaerobic mitochondria, hydrogenosomes or mitosomes. The two former are still able to produce energy, however mitosomes have lost this property but retain the iron–sulfur cluster assembly machinery (Hackstein et al., 2006). Although the origin of these organelles is controversial, most evidence supports evolution from mitochondria (Embley and Martin, 2006). A recent analysis of a *Blastocystis* expressed sequence tag (EST) database notably blurs the distinction between mitochondria and hydrogenosomes (Stechmann et al., 2008).

Our present study reports the first data from the whole genome sequencing project of *B. hominis* that is currently running at the Genoscope (Evry, France). The sequenced isolate belonged to the subtype 7 according to *Blastocystis* nomenclature standardization (Stensvold et al., 2007). It

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 73 40 74 31; fax: +33 4 73 40 76 70.  
E-mail address: [hicham.el\\_alaoui@univ-bpclermont.fr](mailto:hicham.el_alaoui@univ-bpclermont.fr) (H. El Alaoui).

<sup>1</sup> These authors made an equal contribution to the manuscript.

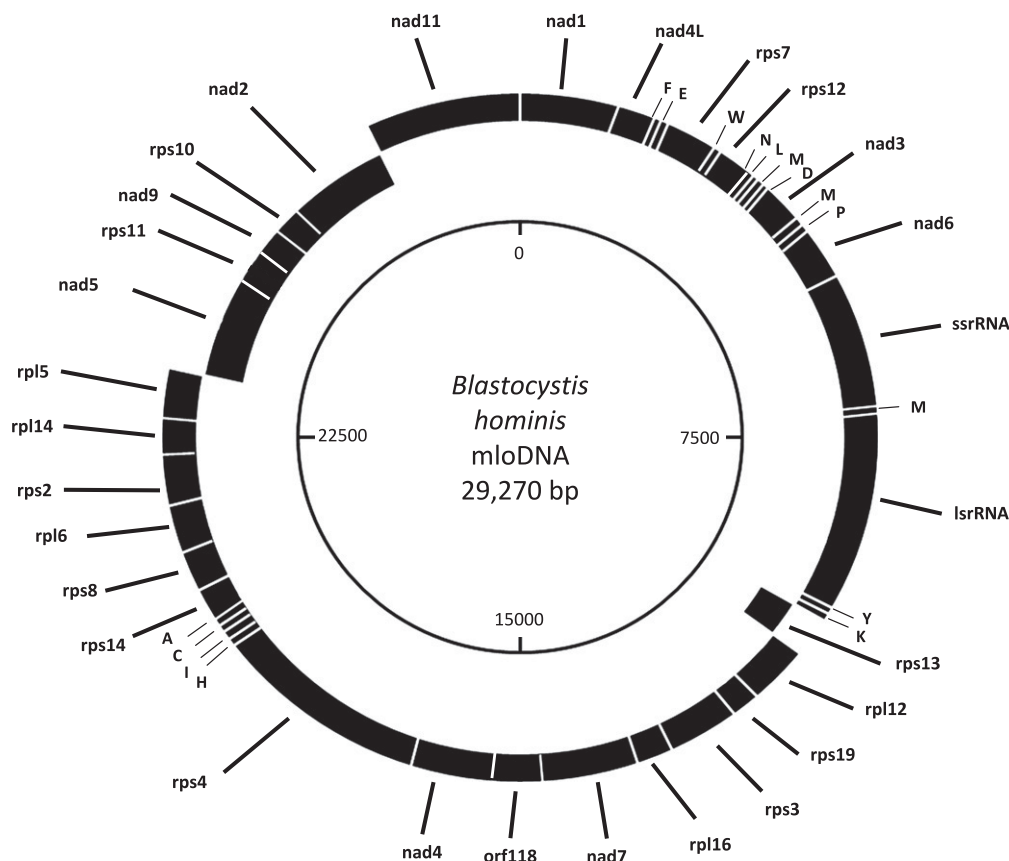


Fig. 1. *Blastocystis hominis* 29,270-bp circular DNA molecule (GenBank Accession No. CU914152) is of mitochondrial origin. Genes are represented by filled rectangles. Clockwise- and anti-clockwise-transcribed genes are located on the outermost and innermost circles, respectively. tRNA genes are indicated by the amino acid they carry. *Blastocystis hominis* circular DNA has a number of genes with significant similarity to mitochondrial genes. These correspond to 10 subunits of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (nad), to five large (rpl) and 11 small (rps) ribosomal proteins, as well as ssrRNA and lsrRNAs. Finally, one open reading frame (Orf118) shares no sequence homology. When compared with *Phytophthora* spp. mitochondrial DNAs, which range from 37,957 for *Phytophthora infestans* (GenBank Accession No. U17009) to 42,977 bp for *Phytophthora sojae* (GenBank Accession No. DQ832717), the *B. hominis* circular DNA molecule has lost genes coding for components of oxidative phosphorylation complexes III (cob), IV (cox1, cox2, cox3) and V (atp1, atp6, atp8, atp9), and for the SecY independent transporter. Stechmann et al. (2008) have characterised a ~6-kbp sequence from *Blastocystis* sp. mitochondria-like organelles (MLOs), which corresponds to the position 2691–8293 on our sequence, thus from the tRNA asparagine gene to the last third of the lsrDNA one.

was obtained from a sample stool of a Singapore patient and maintained axenically and anaerobically as previously described (Ho et al., 1993). Total DNA was extracted from parasites that were included ( $1.10^7$  cells/mL) in low melting point Agar block plugs (Seaplaque, Tebu-Bio) and treated by proteinase K (1 mg/mL, 48 h). Cloning was realised in pcDNA2.1, pCNS and pBBC plasmid vectors, and shotgun sequencing was performed using ABI3730xl analysers and BigDye V3.1 chemistry (Applied Biosystems). The reads were assembled with Arachne algorithm (Broad Institute). During the assembly step, two contigs clustered together forming a 29,270-bp circular DNA (Fig. 1). Artemis software (Sanger Institute, <http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>) and the BLAST network service (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) were, respectively, used to draw the DNA molecule open reading frames (ORFs) and to search for sequence similarities between those and the National Center for Biotechnology Information gene database (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

The *B. hominis* circular-assembled DNA presented mitochondrial characteristics (Barberà et al., 2007). Its overall A + T content was 79.96%, despite a lower A + T content observed in the lsrRNA gene (48.72%). Gene density was high with 94.78% of the entire sequence corresponding to coding DNA. Intergenic regions ranged from 1 to 397 nucleotides, with an average length of 42 nucleotides, and only four exceeding 100 nucleotides. Genome compactness was also seen with six gene overlaps. The *B. hominis* circular genome encompassed 45 genes: 16 tRNA and two rRNA genes, 26 ORFs with an assigned function, and one ORF with no detectable similarity in GenBank. Ten subunits of NADH:ubiquinone oxidoreductase (oxidative phosphorylation complex I) and most ribosomal proteins were easily identified. The conserved domain characterising some ribosomal proteins (RPS 3, 14, 19 and RPL 6, 14) was incomplete in the *B. hominis* counterparts. While the *B. hominis* RPS4 protein was longer than the other known RPS4 proteins and retained the family conserved domain,

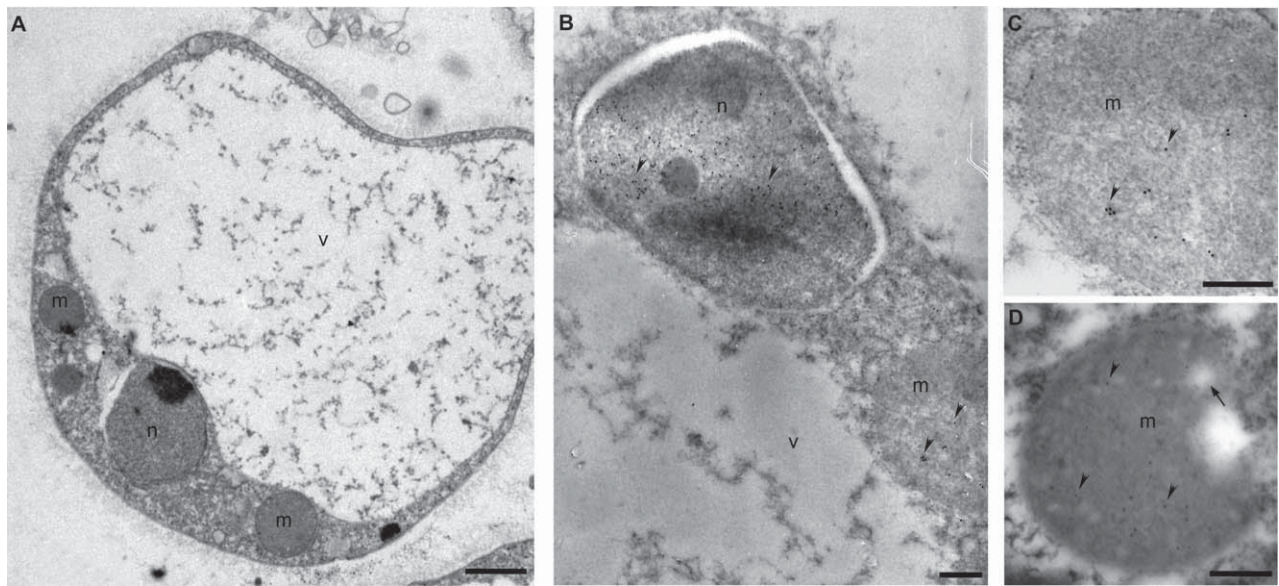


Fig. 2. The 29,270-bp circular DNA molecule is located within *B. hominis* mitochondria-like organelles (MLOs). (A) Electron micrograph of the in vitro cultivated vacuolar form of *B. hominis*. (B–C) Immunostaining of the vacuolar form using anti-DNA antibodies. Both the nucleus (n) and the MLOs (m) are labelled by the antibodies (arrowheads). C corresponds to a higher magnification of the MLO seen in (B). (D) Electron microscopic in situ hybridization (EM-ISH) with a biotinylated-probe designed from the *ssrRNA* sequence of the circular DNA molecule. Anti-biotin antibodies specifically label the MLO (arrowheads) confirming that the circular DNA is located within these organelles. Note the presence of cristae-like structures in the matrix of some MLOs (arrows). v, vacuole. Bars, 1  $\mu$ m for A and 400 nm for B–D. *Associated methods:* For transmission electron microscopy (TEM), in vitro cultivated *B. hominis* cells were embedded in Epikote resin (Agar Scientific, A) or in Unicryl resin (British BioCell International, B–D) following the procedure used by Mazet et al. (2008). In B and C, ultrathin sections were incubated for 3 h with an anti-DNA antibody (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:10) and for 1 h with a 1:100 dilution of goat anti-mouse IgG conjugated with 10 nm colloidal gold particles (Sigma). The *ssrRNA* probe (5'-CCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGG-3') was synthesised by solid-phase phosphoramidite chemistry and labelled by tailing 3' ends with biotin (Eurogentec). The ultrathin section in D was incubated with this probe (1  $\mu$ M) for 3 h at 37  $^{\circ}$ C. Staining was done using goat anti-biotin antibodies (1:50, Sigma) and anti-goat secondary antibodies (1:50, Sigma) conjugated with 5 nm colloidal gold particles as described by Taupin et al. (2006). After staining, ultrathin sections were examined under a JEOL 1200 $\times$  transmission electron microscope.

the RPS 2, 7 and RPL 5 proteins exhibited very low identities with orthologs. Nevertheless, the overall ribosomal gene organisation was conserved between *B. hominis* circular DNA and mtDNA from other sequenced Stramenopiles, such as *Phytophthora* spp. (Martin et al., 2007). The complete circular-assembled DNA of *B. hominis* covered the ~6000-bp fragment obtained by Stechmann et al. (2008) with a strictly conserved gene order. However, within this common region, the identity was around 87% because the DNA originated from two different isolates of *Blastocystis*.

It was previously suggested that *B. hominis* MLOs contained DNA (Nasirudeen and Tan, 2004). We confirmed this by immunoelectron microscopy with an anti-DNA antibody (Fig. 2B and C). The staining was observed not only in the nucleus but also in the MLOs matrix showing that these double-membrane surrounded-organelles contained DNA. The nucleus was more intensely labelled, suggesting DNA concentration discrepancies between both compartments. To demonstrate that the mlo DNA corresponded to the 29,270-bp molecule, electron microscopy in situ hybridization (EM-ISH) assays were carried out on parasites using a specific oligonucleotidic probe targeting the *ssrRNA*. As shown in Fig. 2D, this probe specifically labelled the MLOs, demonstrating their transcription machinery activity.

As the presence of a circular genome in double-membrane surrounded-organelles is a mitochondrial feature, *B. hominis* genome data were scanned for typical mitochondrial genes, i.e. genes coding for proteins involved in oxidative phosphorylation. We thus identified genes encoding 14 subunits of complex I, 10 on the circular mloDNA and four on the nuclear genome. These 14 subunits are considered to be the minimal set required for the bacterial complex I functionality, as exemplified by the *Escherichia coli* NDH-1 complex. Three functional modules can be distinguished in this complex (Vogel et al., 2007): (i) a dehydrogenase module responsible for the oxidation of NADH, (ii) an hydrogenase module guiding the released electrons, and (iii) a proton translocation or transporter module. Moreover, the four subunits of the succinate dehydrogenase complex (complex II) were also found in the *B. hominis* nuclear genome. In contrast, none of the genes coding the ubiquinol:cytochrome *c* oxidase complex (complex III), the cytochrome *c* oxidase complex (complex IV), or the ATP synthase (complex V) were identified. *Blastocystis hominis* genome data also contained sequences encoding an iron-hydrogenase and a pyruvate ferredoxin oxido-reductase (PFOR) both of these being enzymes typically recovered in hydrogenosomes. Finally, we also identified  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of succinyl-CoA synthetase (SCS), involved in energy production both in hydrogenosomes and mitochondria.



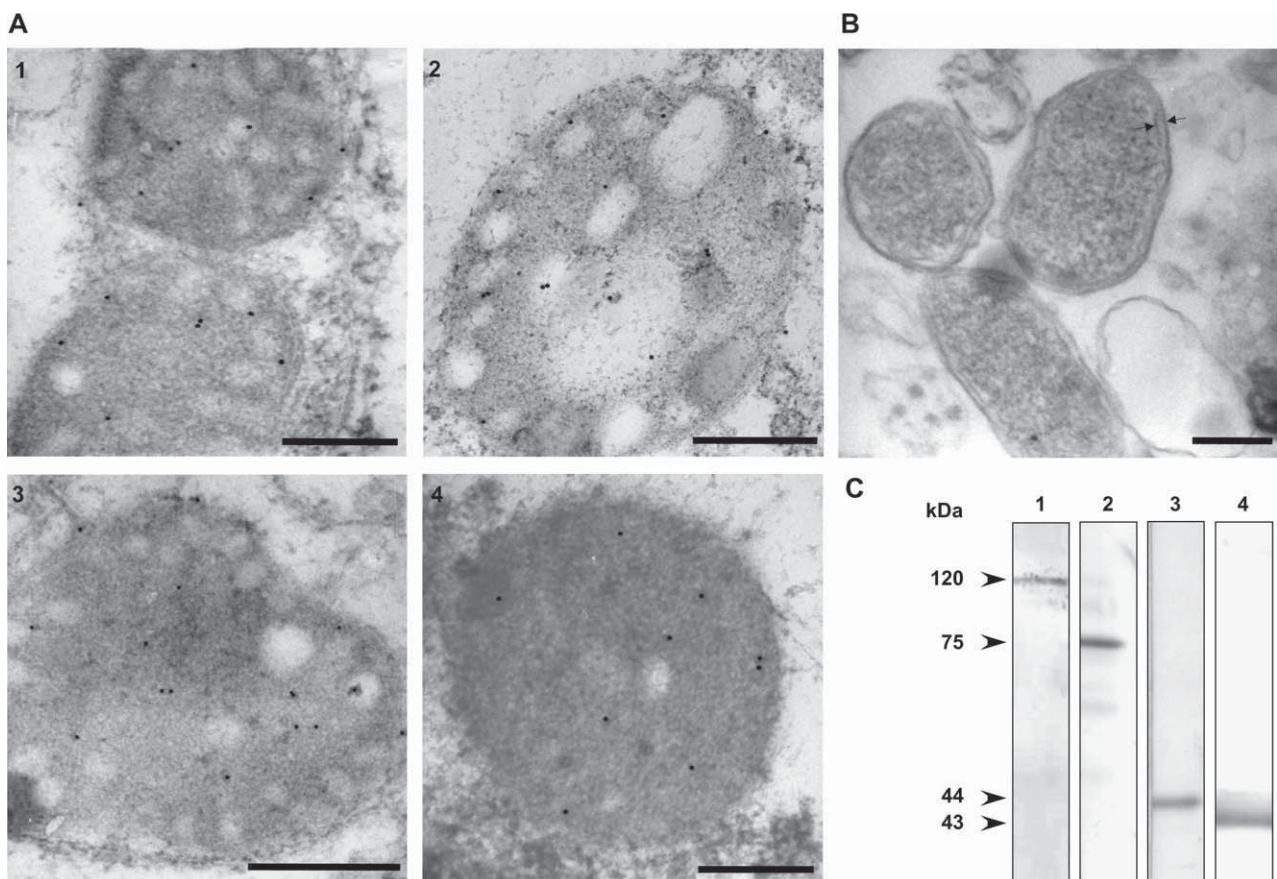


Fig. 3. *Blastocystis hominis* mitochondria-like organelles (MLOs) contain both hydrogenosomal and typical mitochondrial proteins. (A) Transmission electron microscopy (TEM) immunogold labelling of *B. hominis* sections using antibodies produced against pyruvate ferredoxin oxido-reductase (PFOR) (1), iron-hydrogenase (2), NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit 7 (NAD7) (3) and  $\beta$ -succinyl-CoA synthetase  $\beta$ -SCS) (4). A similar immunostaining pattern of the MLO matrix is observed with the four mouse antisera. (B) Electron micrograph of the purified MLOs with a better visualization of the two closely adjacent membranes (arrows). Bars, 400 nm. (C) Immunodetection of PFOR (1), iron-hydrogenase (2), NAD7 (3) and  $\beta$ -SCS (4) in a protein extract from a purified-MLO fraction. *Associated methods*: partial sequences of genes coding for PFOR, iron-hydrogenase, NAD7 and  $\beta$ -SCS were PCR-amplified and cloned into the bacterial expression vector pET-23b (Novagen). Expression of the His-tagged recombinant proteins (PFOR amino acids 1–1223, iron-hydrogenase amino acids 157–759, NAD7 amino acids 15–230 and  $\beta$ -SCS amino acids 255–425) was analysed in *Escherichia coli* BL21 Star strain after isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. Mice were injected i.p. with each purified recombinant protein homogenised with FCA (Sigma), and identical injections were given on days 14 and 21 with Freund incomplete adjuvant (Sigma). Sera were collected 1 week after the last injection. For immunogold staining (A), mouse antisera were used at a 1:50 dilution. Proteins from the purified MLOs, solubilised by Laemmli buffer 15 min at 100 °C, were subjected to SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P; Millipore) for Western blot analysis (B). The membranes were incubated with sera (1:300 dilution) and with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, A, M (1:10,000, Sigma). Bound antibodies were revealed using NBT-BCIP (Promega).

For immunofluorescence and immunoelectron microscopy assays, polyclonal antibodies were raised against four proteins: PFOR, iron-hydrogenase, the SCS  $\beta$  subunit ( $\beta$ -SCS) and the NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit 7 (NAD7, its gene being harboured by the circular DNA). In immunofluorescence assays, a punctuate staining was observed on whole cells with each polyclonal serum, suggesting that the four studied proteins were compartmentalised within the *B. hominis* cells (data not shown) as demonstrated for iron-hydrogenase by Stechmann et al. (2008). Immunoelectron microscopy demonstrated that these four proteins were precisely located in the MLO matrix (Fig. 3A). We observed two morphological types of MLOs, one with cristae as described previously (Zierdt et al., 1988) and one without. Both types could co-exist in a given parasite and were stained by our antibodies

and the oligonucleotide probe (Figs. 2 and 3, and data not shown).

We developed a protocol for the purification of *B. hominis* MLOs based on the procedures of Drmota et al. (1996) and Nasirudeen and Tan (2004). Briefly,  $7 \times 10^8$  parasites were resuspended in isotonic medium (0.25 M sucrose, 10 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, pH 7.5) and disrupted in a Potter-Elvehjem tissue homogeniser. After lysate centrifugation, the MLO-rich fraction was resuspended in the isotonic medium and then mixed with an equal volume of 90% Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences) in DHE buffer (2 mM dithiothreitol, 30 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.5). The purified MLOs were then collected by centrifugation at 80,000g for 2 h 30 min and resuspended in DHE buffer. Western blot analyses were performed on proteins extracted from the purified MLO

fraction (Fig. 3B). Sera against  $\beta$ -SCS, NAD7, iron-hydrogenase and PFOR each reacted with a single band at 43, 44, 75, and 120 kDa, respectively (Fig. 3C). This was consistent with the predicted molecular sizes, and validated the functionality of *B. hominis* MLO translational machinery.

Our data indicate that *B. hominis* MLOs are beyond doubt mitochondria even though they lack the cytochromes and cytochrome oxidase (Zierdt, 1986). Genes coding ssrRNAs and lsrRNAs, tRNAs, and electron transport chain (ETC) complex I subunits are clearly typically mitochondrial, as strengthened by previous phylogenetic analyses showing their clustering with mitochondrial clades linked to  $\alpha$ -proteobacteria (Stechmann et al., 2008). Thus, the two Stramenopiles *B. hominis* and *Phytophthora* spp. should share a common ancestor, and their organelles should probably originate from an endosymbiotic  $\alpha$ -proteobacteria. Losses of both the ETC components and the ability to produce energy by oxidative phosphorylation are probably due to an adaptive evolution to anaerobic or microaerophilic environments. *B. hominis* organelles have the mitochondrial ETC complexes I and II and these may produce the proton gradient previously shown by biochemical studies (Nasirudeen and Tan, 2004; Stechmann et al., 2008). In parasitic helminth anaerobic mitochondria, malate is reduced to succinate by two reactions, one functioning in the reverse direction of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. These steps are essential for the redox balance providing cofactor regeneration. In this case fumarate is the terminal electron acceptor of the ETC allowing ATP-formation (Tielens et al., 2002). This could be the same for *B. hominis*, according to preliminary nuclear magnetic resonance (NMR) studies that argue for succinate as the main produced metabolite (data not shown).

Strikingly, we found specific hydrogenosomal enzymes in the MLOs (PFOR and iron-hydrogenase). According to genome data, *B. hominis* possesses only one hydrogenase and this is rather unusual as it is fused with a flavodoxin domain. A similar hydrogenase was recently described in the *Trichomonas vaginalis* genome draft (Carlton et al., 2007). Nonetheless we could not obtain evidence for hydrogen production nor could we detect any D2/H<sup>+</sup> exchange (signature of hydrogenase catalytic site, Jouanneau et al., 1980) in our *B. hominis* culture conditions (data not shown), calling into question the role of this enzyme. We thus incline towards the hypothesis that the MLOs are anaerobic mitochondria. Our data thus reinforce the theory of  $\alpha$ -proteobacteria endosymbiosis for double-membrane surrounded-organelles in *B. hominis*. The discussion on MLO metabolism and phylogenetic issues will be addressed more in detail in a future paper on the complete nuclear genome.

## Acknowledgments

M.R. was supported by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de

la Recherche (MENESR). We are grateful to Laurent Cournac (CEA Cadarache IBEB/SBVME, Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues, France) for experiments concerning hydrogen production in *B. hominis* cultures. We also thank Muriel Mazet for her precious advice for MLO purification optimisation and Damien Brosson for electron micrograph (Fig. 2A). Finally, we wish to thank Charles White (UMR CNRS 6247 Génétique, Reproduction et Développement, Université Blaise Pascal, France) for helpful reading of the paper.

## References

- Barberà, M.J., Ruiz-Trillo, I., Leigh, J., Hug, L.A., Roger, A.J., 2007. The diversity of mitochondrion-related organelles amongst eukaryotic microbes. In: Martin, W.F., Müller, M. (Eds.), *Origin of Mitochondria and Hydrogenosomes*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 239–275.
- Carlton, J.M., Hirt, R.P., Silva, J.C., Delcher, A.L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J.R., Bidwell, S.L., Alsmark, U.C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C.J., Dacks, J.B., Foster, P.G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., Westrop, G.D., Muller, S., Dessi, D., Fiori, P.L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuer, F.D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M.T., Hayes, R.D., Mukherjee, M., Okumura, C.Y., Schneider, R., Smith, A.J., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B.J., Perte, M., Feldblyum, T.V., Utterback, T.R., Shu, C.L., Osoegawa, K., de Jong, P.J., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, S.B., Logsdon Jr., J.M., Henze, K., Gupta, A., Wang, C.C., Dunne, R.L., Upcroft, J.A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S.L., Tang, P., Chiu, C.H., Lee, Y.S., Embley, T.M., Coombs, G.H., Mottram, J.C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C.M., Johnson, P.J., 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315, 207–212.
- Drmota, T., Proost, P., Van Ranst, M., Weyda, F., Kulda, J., Tachezy, J., 1996. Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 221–234.
- Embley, T.M., Martin, W., 2006. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440, 623–630.
- Hackstein, J.H., Tjaden, J., Huynen, M., 2006. Mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes: products of evolutionary tinkering! *Curr. Genet.* 50, 225–245.
- Ho, L.C., Singh, M., Suresh, G., Ng, G.C., Yap, E.H., 1993. Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitol. Res.* 79, 614–616.
- Jouanneau, Y., Kelley, B.C., Berlier, Y., Lespinat, P.A., Vignais, P.M., 1980. Continuous monitoring, by mass spectrometry, of H<sub>2</sub> production and recycling in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* 143, 628–636.
- Martin, F.N., Bensasson, D., Tyler, B.M., Boore, J.L., 2007. Mitochondrial genome sequences and comparative genomics of *Phytophthora ramorum* and *P. sojae*. *Curr. Genet.* 51, 285–296.
- Mazet, M., Diogon, M., Alderete, J.F., Vivarès, C.P., Delbac, F., 2008. First molecular characterisation of hydrogenosomes in the protozoan parasite *Histomonas meleagridis*. *Int. J. Parasitol.* 38, 177–190.
- Nasirudeen, A.M., Tan, K.S., 2004. Isolation and characterization of the mitochondrion-like organelle from *Blastocystis hominis*. *J. Microbiol. Methods* 58, 101–109.
- Patterson, D.J., 1999. The diversity of eukaryotes. *Am. Nat.* 154, S96–S124.
- Stark, D., van Hal, S., Marriott, D., Ellis, J., Harkness, J., 2007. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *Int. J. Parasitol.* 37, 11–20.
- Stechmann, A., Hamblin, K., Perez-Brocal, V., Gaston, D., Richmond, G.S., van der Giezen, M., Clark, C.G., Roger, A.J., 2008. Organelles in



- Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Curr. Biol.* 18, 580–585.
- Stensvold, C.R., Suresh, G.K., Tan, K.S., Thompson, R.C., Traub, R.J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H., Clark, C.G., 2007. Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. *Trends Parasitol.* 23, 93–96.
- Taupin, V., Méténier, G., Delbac, F., Vivarès, C.P., Prensier, G., 2006. Expression of two cell wall proteins during the intracellular development of *Encephalitozoon cuniculi*: an immunocytochemical and in situ hybridization study with ultrathin frozen sections. *Parasitology* 132, 815–825.
- Tielens, A.G., Rotte, C., van Hellemond, J.J., Martin, W., 2002. Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* 27, 564–572.
- Vogel, R.O., Smeitink, J.A., Nijtmans, L.G., 2007. Human mitochondrial complex I assembly: a dynamic and versatile process. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1215–1227.
- Zierdt, C.H., 1986. Cytochrome-free mitochondria of an anaerobic protozoan – *Blastocystis hominis*. *J. Protozool.* 33, 67–69.
- Zierdt, C.H., Donnelly, C.T., Muller, J., Constantopoulos, G., 1988. Biochemical and ultrastructural study of *Blastocystis hominis*. *J. Clin. Microbiol.* 26, 965–970.

### III. Article 3 – Les organites apparentés aux mitochondries (MLOS) de *Blastocystis* sp. présentent des caractéristiques fonctionnelles similaires aux mitochondries <sup>2</sup>

La présence au sein d'un organisme anaérobie tel que *Blastocystis* sp. d'organites morphologiquement similaires aux mitochondries, possédant un génome mitochondrial, et des enzymes typiquement hydrogénosomales, indique que de tels organites sont vraisemblablement des intermédiaires entre les mitochondries anaérobies et les hydrogénosomes.

Les données génomiques apportées par l'analyse de banques d'EST (Stechmann *et al.*, 2008), et par notre reconstruction du métabolisme des MLOs à l'aide des données d'annotation, montrent effectivement que ces organites possèdent de nombreux métabolismes typiquement mitochondriaux, comme l'assemblage des protéines à centres Fe/S, la  $\beta$ -oxydation et la biosynthèse de type II des acides gras, le système de défense contre le stress antioxydant, ou encore le métabolisme de certains acides aminés comme l'alanine ou la valine.

Les MLOs possèdent néanmoins un cycle de Krebs et une chaîne respiratoire incomplets, dont les enzymes peuvent entrer dans le phénomène de respiration du fumarate, rencontré chez les mitochondries anaérobies de certains helminthes parasites (Tielens *et al.*, 2002). Malgré l'existence d'une chaîne respiratoire tronquée (composée uniquement des complexes I et II), les MLOs présentent un potentiel transmembranaire, repérable par le marquage fluorescent de certaines molécules spécifiques comme la rhodamine 123 (Nasirudeen and Tan, 2004).

Nous avons ainsi pu montrer *in vivo*, par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des complexes I et II, que ce potentiel transmembranaire était dépendant de l'activité de ces deux complexes, démontrant le rôle majeur de cette chaîne respiratoire particulière dans la génération du gradient protonique électrochimique.

---

<sup>2</sup> Les travaux présentés ici feront prochainement l'objet de la soumission d'une publication



La description d'organites aussi singuliers que ceux de *Blastocystis* sp. fournit un exemple frappant de l'évolution et de l'adaptation des hydrogénosomes et des MLOs à leurs environnements, à partir de leur ancêtre mitochondrial.



# Les organites apparentés aux mitochondries (MLOs) de *Blastocystis* sp. présentent des caractéristiques fonctionnelles similaires aux mitochondries

Michaël Roussel<sup>1,2</sup>, Ivan Wawrzyniak<sup>1,2</sup>, Nicolas Blot<sup>1,2</sup>, Marie Diogon<sup>1,2</sup>  
et Frédéric Delbac<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup>CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63177 Aubière, France

*A soumettre*

## Résumé

*Blastocystis* sp. est un straménopile parasite fréquemment rencontré dans le tractus intestinal de l'homme et de divers animaux. Bien qu'évoluant en anaérobiose, ce microorganisme possède des organites morphologiquement similaires aux mitochondries, appelés mitochondrion-like organelles (MLOs). Nous avons précédemment localisé au sein de ces organites un génome circulaire de type mitochondrial, ainsi que des protéines mitochondriales (sous-unité 7 du complexe I,  $\beta$ -succinyl-CoA synthétase ( $\beta$ -SCS)) et hydrogénosomales (pyruvate:ferrédoxine oxydoréductase (PFOR), hydrogénase à fer).

Des analyses *in silico*, réalisées grâce aux données d'annotation apportées par le séquençage du génome de *Blastocystis* sp. ST7, nous ont permis d'identifier 365 protéines potentiellement importées aux MLOs, dont 299 comportent un signal d'import N-terminal caractéristiques des protéines mitochondriales. L'établissement d'un modèle prédictif des voies métaboliques associées aux MLOs montre que ces organites sont impliqués dans de nombreux métabolismes caractéristiques des mitochondries (assemblage des centres Fe/S,  $\beta$ -oxydation, synthèse de type II des acides gras), mais aussi des hydrogénosomes. Les MLOs présentent également un métabolisme énergétique similaire aux mitochondries anaérobies. Ils comportent en effet une chaîne de transporteurs d'électrons, composée uniquement des



complexes I et II, fonctionnant vraisemblablement comme un système NADH-fumarate réductase.

Les MLOs de *Blastocystis* sp., tout comme l'hydrogénosome du cilié *Nyctotherus ovalis*, présentent donc des caractéristiques métaboliques communes aux mitochondries anaérobies et aux hydrogénosomes, révélant l'existence d'un continuum évolutif des fonctions métaboliques présentes chez les mitochondries et les organites apparentés, conduisant à une adaptation accrue des organismes à leur environnement.

## Introduction

Les protistes sont des eucaryotes unicellulaires qui, par définition, comportent des compartiments cellulaires tels que le noyau, l'appareil de golgi, ou des organites à double membrane comme les mitochondries. Chacun de ces compartiments est défini par un métabolisme caractéristique, impliquant un pool de protéines et d'enzymes spécifiques. Par exemple, la principale fonction cellulaire de la mitochondrie aérobie est la production d'ATP de la cellule, réalisée grâce au cycle de Krebs et à une chaîne de transporteurs d'électrons (ou chaîne de phosphorylation oxydative). Cet organite a également un rôle clef dans le phénomène d'apoptose, la  $\beta$ -oxydation et la synthèse des acides gras, l'assemblage des protéines à centre Fer-Soufre (Fe/S) et hémiques, la synthèse des hormones stéroïdes, ou encore l'homéostasie du calcium de la cellule (van der Giezen and Tovar, 2005). Cette intime coopération existant entre la mitochondrie et la cellule eucaryote est le résultat d'une longue évolution, impliquant le transfert de nombreux gènes de l'endosymbionte ancestral vers le génome nucléaire de la cellule hôte (Timmis *et al.*, 2004), de la perte de gènes redondants, de l'acquisition de gènes bénéfiques par transferts horizontaux (Adams and Palmer, 2003).

L'incroyable diversité physico-chimique dont font preuve les différentes niches écologiques conditionne ces événements évolutifs, et conduit à une adaptation optimale des organismes. Celle-ci est particulièrement visible pour les microorganismes colonisant des





environnements anaérobies, comme les sédiments marins et d'eau douce, ou le tractus intestinal. Ces microorganismes ne possèdent donc pas de mitochondries aérobies classiques – incapables de fonctionner en absence d'oxygène – mais des organites aux propriétés métaboliques différentes, autorisant la production d'ATP en conditions d'anoxie. Les mitochondries présentes chez certains eucaryotes anaérobies facultatifs, appelées mitochondries anaérobies, présentent en effet une chaîne de phosphorylation oxydative distincte de celle des mitochondries aérobies, et utilisent non pas le dioxygène, mais le fumarate ou le nitrate comme accepteur final d'électrons (Tielens *et al.*, 2002). Ce type de mitochondries est retrouvé chez des organismes unicellulaires, comme le flagellé *Euglena* sp. (Hoffmeister *et al.*, 2004), mais également chez certains helminthes parasites, tels que *Fasciola* sp. ou *Ascaris* sp. (Tielens and Van Hellemond, 1998; Tielens *et al.*, 2002).

Cependant, de nombreux protozoaires vivant dans des conditions pauvres en oxygène ne contiennent pas de mitochondries anaérobies, mais des organites apparentés aux mitochondries, nommés hydrogénosomes. Les hydrogénosomes ont été découverts dans les années 1970 chez *Tritrichomonas foetus*, flagellé parasite des bovins et des félins (Cerkasovova *et al.*, 1973; Lindmark and Muller, 1973) et chez le parasite humain *Trichomonas vaginalis* (Lindmark *et al.*, 1975). Ces organites ont ensuite été décrits chez plusieurs ciliés anaérobies comme *Nyctotherus ovalis* (Berger and Lynn, 1992; Boxma *et al.*, 2005; Paul *et al.*, 1990) et chez certains champignons anaérobies tels que le chytride *Neocallimastix* sp. (Yarlett *et al.*, 1986). Il est intéressant de noter que ces différents organismes ont une distribution phylogénétique relativement éloignée, seules leurs conditions environnementales de survie, liées à l'absence d'oxygène, sont similaires.

Les hydrogénosomes sont des organites dépourvus de génome, producteurs d'hydrogène et d'énergie sous forme d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat. A la différence des mitochondries, ils ne comportent ni chaîne de transporteurs d'électrons ni cycle de Krebs. Cependant, de nombreux marqueurs protéiques mitochondriaux ont été retrouvés au sein de ces organites, comme les protéines chaperonnes Hsp60 et Hsp70 (Bui *et al.*, 1996), des protéines intervenant dans le système d'import mitochondrial (Dyall *et al.*,



2000) et l'assemblage des protéines à centres Fe/S, ou encore certaines sous-unités du complexe I de la chaîne respiratoire (Hrdy *et al.*, 2004; Sutak *et al.*, 2004). Les hydrogénosomes sont tout de même caractérisés par deux enzymes clefs, absentes des mitochondries : la Pyruvate:Ferrédoxine Oxydoréductase (PFOR), qui catalyse la décarboxylation du pyruvate (effectuée par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) dans les mitochondries), et une hydrogénase à fer ([Fe]-hydrogénase), responsable de la production d'hydrogène (Muller, 1993). Toutefois, de récentes études révèlent que les hydrogénosomes, initialement définis comme des organites anaérobies à double membrane dépourvus de génome et producteurs d'hydrogène, présentent vraisemblablement des capacités métaboliques beaucoup plus vastes (Barbera *et al.*, 2010; Shiflett and Johnson, 2010).

Ainsi, l'hydrogénosome du cilié anaérobie *Nyctotherus ovalis*, organisme vivant dans le tractus intestinal des cafards, présente une morphologie similaire aux mitochondries (présence de crêtes), comporte un génome (Boxma *et al.*, 2005), et renferme un métabolisme intermédiaire entre les mitochondries et les hydrogénosomes. Les auteurs des derniers travaux menés sur le métabolisme de cet organite particulier n'utilisent d'ailleurs plus le terme « hydrogénosome », mais le qualifient de « mitochondrie productrice d'hydrogène » (de Graaf *et al.*, 2011). Cet organite possède en effet une hydrogénase à fer, et des composants typiquement mitochondriaux comme le complexe PDH, un cycle de Krebs incomplet, une chaîne de transporteurs d'électrons particulière (composée uniquement des complexes I et II), ainsi que de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme de certains acides aminés, l'assemblage des centres Fe/S, le système de clivage de la glycine, le système d'import des protéines, ou la défense contre le stress oxydant. Il est également intéressant de noter que le produit final majoritaire de ce métabolisme est le succinate, une caractéristique des mitochondries anaérobies. La plupart de ces protéines comportent à leur extrémité N-terminale une séquence signal homologue à celle impliquée dans l'import des protéines mitochondriales, suggérant que la mitochondrie productrice d'hydrogène de *N.*



*ovalis* utilise un système d'import des protéines similaire à celui des mitochondries (Boxma *et al.*, 2005; de Graaf *et al.*, 2011; Hackstein *et al.*, 2006).

Le cas de l'organite de *N. ovalis* n'est pas un cas isolé. En effet, l'existence de tels organites a récemment été décrite chez le flagellé anaérobie *Trimastix pyriformis* (Hampl *et al.*, 2008), et les amibes *Mastigamoeba balamuthi* (Gill *et al.*, 2007), et *Sawyeria marylandensis* (Barbera *et al.*, 2010), qui comportent également des enzymes typiquement hydrogénomales et mitochondriales. Les organites à double membrane de *Blastocystis* sp., connus sous le nom de Mitochondrion-Like Organelles (MLOs) présentent une situation comparable. Les MLOs de ce straménopile anaérobie présentent une morphologie proche des mitochondries. De manière similaire à la mitochondrie modifiée de *N. ovalis*, les MLOs de *Blastocystis* sp. possèdent également un génome de type mitochondrial. Le séquençage de ce génome, réalisé pour les sous-types 1 (ST1), 4 (ST4) et 7 (ST7), révèle une taille comprise entre 27,7 et 29,3 kpb (Perez-Brocal and Clark, 2008; Wawrzyniak *et al.*, 2008). De forme circulaire, cette molécule d'ADN code pour une partie de la machinerie de traduction et certaines sous-unités du complexe I. Par contre, à la différence des génomes mitochondriaux d'autres straménopiles, elle ne comporte aucun gène codant pour les complexes III, IV et pour l'ATP synthase.

Les données apportées par l'analyse d'une banque d'EST ont mis en évidence 110 protéines potentiellement importées aux MLOs, et montrent que l'organite de *Blastocystis* sp. comporte un métabolisme très similaire aux mitochondries (Stechmann *et al.*, 2008). Celui-ci semble en effet comporter une chaîne de transporteurs d'électrons composée des complexes I et II, un cycle de Krebs incomplet, et de nombreux métabolismes caractéristiques des mitochondries, tels que le métabolisme de certains acides aminés, le système de clivage de la glycine, le cycle mitochondrial de l'urée, l'assemblage des centres Fe/S, ou le système d'import des protéines. Les MLOs renferment néanmoins des enzymes caractéristiques des hydrogénosomes impliquées dans la décarboxylation du pyruvate et la production d'ATP : hydrogénase à fer, PFOR, acétate:succinate-CoA transférase (ASCT) et succinyl-CoA synthétase (SCS).



Nous proposons ici une reconstruction métabolique complète du MLO, réalisée à partir des données génomiques fournies par le séquençage et l'annotation du génome de *Blastocystis* sp. ST7 (Denoeud *et al.*, 2011). La prédiction du protéome de ces organites, effectuée grâce à la recherche des protéines potentiellement importées aux MLOs, confirme leur caractère intermédiaire entre les mitochondries et les hydrogénosomes, révélant un continuum évolutif des fonctions biochimiques des mitochondries et organites apparentés. Malgré l'existence d'une chaîne respiratoire incomplète (composée uniquement des complexes I et II), les MLOs présentent un potentiel transmembranaire, repérable par le marquage fluorescent de certaines molécules comme JC-1. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'activité des complexes I et II mitochondriaux nous a permis de montrer que ce potentiel transmembranaire est dépendant de l'activité de ces deux complexes. Ces données démontrent le rôle majeur de cette chaîne respiratoire particulière dans la génération du gradient protonique électrochimique et dans la survie du parasite.

## **Matériel et méthodes**

### **Culture du parasite**

Un isolat de sous-type 7 (ST7) de *Blastocystis* sp. a été utilisé pour l'ensemble des expérimentations. Le parasite a été cultivé en tubes de 15 ml, dans 10 ml de milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) supplémenté en sérum de cheval 10% (Gibco), et incubé à 37°C en atmosphère anaérobie (AnaeroGen Pack, Oxoid) dans des jarres de 2,5 L (Oxoid, United Kingdom). Le changement du milieu de culture est réalisé tous les deux jours.

### **Identification des protéines potentiellement importées aux MLOs**

L'ensemble du protéome du parasite (estimé à 6020 protéines) a été criblé à l'aide des logiciels MitoProt, algorithme de prédiction des séquences d'import mitochondriales, et MITOPRED, programme d'identification de protéines mitochondriales fondé sur la recherche





d'homologies avec les domaines protéiques de la base de données Pfam (base de données animale/levure). Après l'utilisation d'un script, seules les séquences protéiques comportant un score d'au moins 0,5 et 85% pour MitoProt et MITOPRED respectivement ont été prises en compte. Ce fichier a ensuite été utilisé dans le logiciel KAAS (KEGG Automatic Annotation Server) dans le but de générer de manière automatique les cartes métaboliques KEGG. Les données d'annotation du génome n'étant parfois pas suffisantes pour l'identification de la nature de certaines enzymes (PRIAM juillet 2006 ENZYME release), des analyses BLAST contre la base de données non-redondante (nr) ont également été effectuées.

### **Mise en évidence du potentiel transmembranaire des MLOs par le marqueur JC-1**

Une culture de 2 jours de *Blastocystis* sp. ST7 a été utilisée pour l'ensemble des expérimentations. Chacune des expérimentations a été réalisée en triplicat. Les parasites sont tout d'abord centrifugés à 600 g pendant 10 min, puis lavés deux fois en milieu IMDM. Le culot parasitaire est ensuite repris dans du milieu IMDM afin d'obtenir une concentration de  $1.10^6$  cellules/ml. Les différents inhibiteurs spécifiques des complexes I (roténone, MPP<sup>+</sup>), II (3-NPA, TTFA), et III (antimycine A) mitochondriaux, préalablement dilués dans une solution de DMSO, sont ajoutés aux parasites aux concentrations finales suivantes : roténone (1 mM), MPP<sup>+</sup> (4 mM), 3-NPA (3 mM), TTFA (3 mM). Un témoin DMSO 1% est également réalisé afin d'évaluer sa toxicité sur les cellules parasitaires. Les parasites sont ensuite incubés à 37°C pendant 10 min, puis la solution de JC-1 (Invitrogen) est ajoutée à une concentration finale de 2  $\mu$ M, selon les recommandations liées à l'utilisation du marqueur JC-1. Les parasites sont incubés de nouveau à 37°C pendant 15 min. Les cellules parasitaires sont ensuite lavées deux fois en milieu IMDM, une fois en tampon PBS, puis observées sous un microscope à épifluorescence (Leica DMIRB).



## Résultats et discussion

### Stratégie adoptée pour la prédiction des protéines potentiellement importées aux MLOs de *Blastocystis* sp.

Parmi les 110 protéines prédites par Stechmann et ses collaborateurs, seules 34 possèdent à leur extrémité N-terminale un signal d'import mitochondrial, mis en évidence par l'utilisation de logiciels de prédiction (Stechmann *et al.*, 2008). Ceci peut s'expliquer par le fait que les séquences protéiques déduites des banques d'EST sont généralement incomplètes dans leur partie N-terminale, ce qui rend donc extrêmement difficile la prédiction de protéines potentiellement importées aux mitochondries. Le système d'import mitochondrial implique en effet la présence d'une séquence signal à l'extrémité N-terminale de la protéine, permettant à celle-ci d'être adressée dans l'organite, et qui sera ensuite clivée. De nombreux outils de bioanalyses s'appuient sur cette propriété, comme le logiciel MitoProt (Claros and Vincens, 1996). Cependant, de récentes études montrent qu'un grand nombre de protéines mitochondriales ne possèdent pas de signal d'import à l'extrémité N-terminale, mais comportent plusieurs séquences situées dans la région interne de la protéine qui joueraient un rôle dans l'adressage à la mitochondrie (Bolender *et al.*, 2008). L'investigation de protéines potentiellement importées aux mitochondries est donc vouée à l'échec par la simple utilisation d'outils de prédiction de signaux d'import N-terminaux.

En vue d'établir le protéome *in silico* des MLOs, nous avons utilisé deux logiciels différents de prédiction de protéines mitochondriales : MitoProt et MITOPRED. MitoProt (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>) est un outil conçu pour la recherche de signaux d'import mitochondriaux en N-terminal, et le repérage de la position putative du site de clivage de la séquence d'import. Pour cela, cet algorithme considère de nombreux paramètres, comme la composition physico-chimique de l'extrémité N-terminale, ou la présence de régions hydrophobes (Claros and Vincens, 1996). Ce programme est relativement puissant pour la reconnaissance de la séquence du signal d'import



mitochondrial et la localisation du site de clivage, mais ne parvient pas à prédire les protéines comportant une séquence d'import interne. Pour palier à l'absence de séquence signal à l'extrémité N-terminale et s'affranchir de la présence de faux-négatifs, nous avons utilisé un second algorithme, MITOPRED (<http://bioapps.rit.albany.edu/MITOPRED/>), spécialisé dans la prédiction de protéines mitochondriales. A la différence de MitoProt, ce logiciel ne s'arrête pas à la prédiction de séquences signales situées en N-terminal, mais compare également les valeurs de certains paramètres caractéristiques des séquences protéiques mitochondriales (grâce à la base de données de domaines protéiques Pfam), comme la composition en acides aminés, ou le point isoélectrique. Les concepteurs précisent que l'efficacité de prédiction de MITOPRED est supérieure à d'autres programmes tels que TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) ou PSORT (<http://psort.hgc.jp/form.html>) (Guda *et al.*, 2004).

Notre approche, basée sur l'existence d'un signal d'import mitochondrial à l'extrémité N-terminale (MitoProt), et la recherche de profils protéiques caractéristiques des protéines mitochondriales (MITOPRED), est certainement une bonne méthode pour la prédiction des protéines potentiellement importées aux MLOs. Gaston et collaborateurs, en évaluant l'efficacité de nombreux programmes de prédiction (Predotar, MITOPRED, CBOrg, PSORT, Mitoprot) recommandent en effet la combinaison de programmes comme MitoProt et MITOPRED pour la recherche de protéines potentiellement mitochondriales à partir de données génomiques (Gaston *et al.*, 2009).

### **La plupart des protéines potentiellement importées aux MLOs de *Blastocystis* sp. comportent un signal d'import typiquement mitochondrial**

Notre analyse met en évidence 365 protéines potentiellement localisées au sein des MLOs, dont 299 comportent une séquence d'import à l'extrémité N-terminale. Parmi les 66 protéines pour lesquelles aucune séquence de signal d'import n'a été prédite, 13 sont des protéines mitochondriales majoritairement impliquées dans le métabolisme mitochondrial

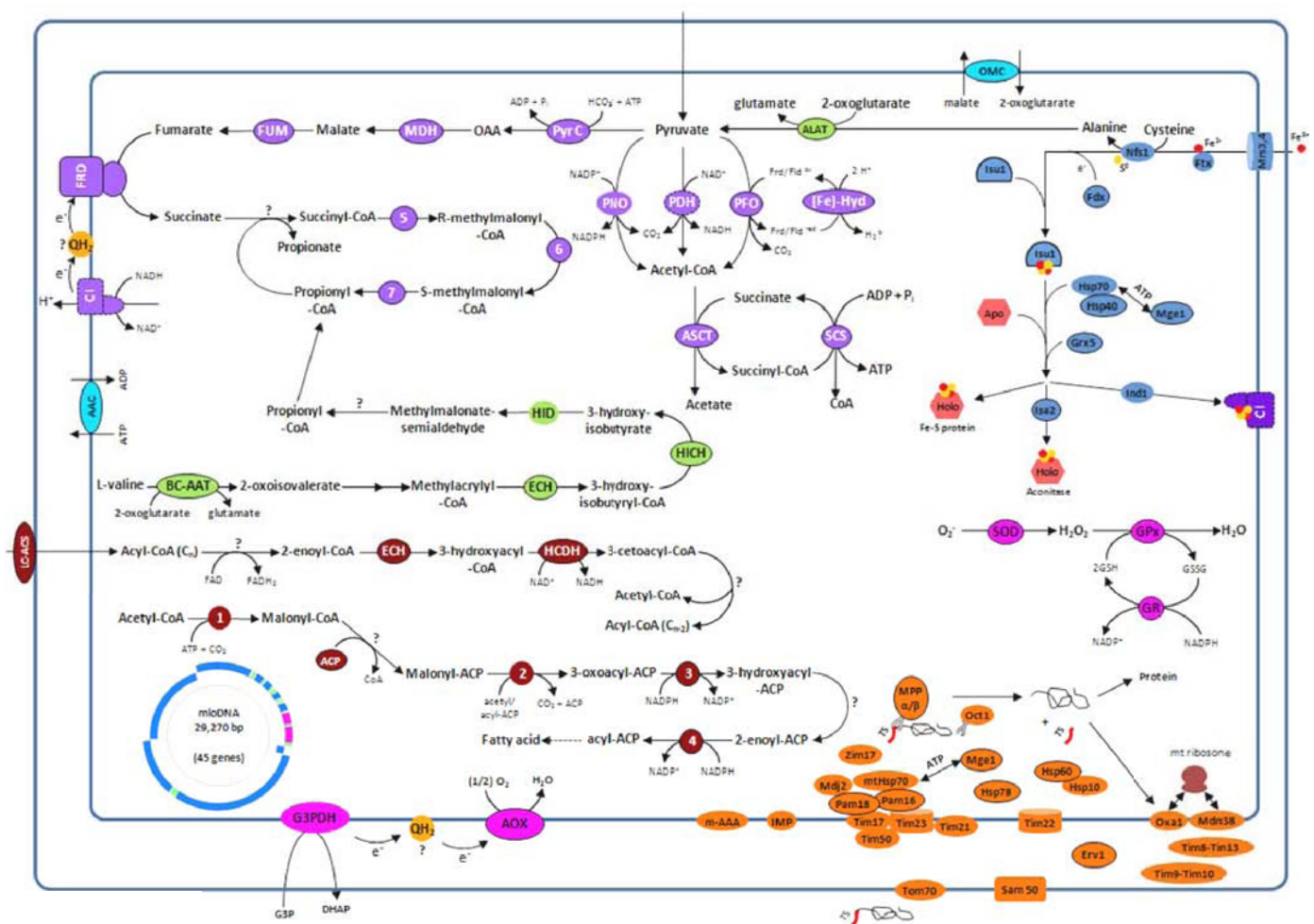


de certains acides aminés. Cette observation peut être expliquée par l'incapacité de MitoProt à prédire le site de clivage du signal d'import N-terminal, liée à une divergence de séquence dans la partie N-terminale de ces protéines, ou à une localisation du signal d'import dans une partie interne de leur séquence protéique. Il est intéressant de noter que nous avons pu identifier, parmi les 365 protéines prédites, 72 protéines hypothétiques sans fonction connue, dont 31 qui ne comportent aucune homologie avec les bases de données. Toutes ces protéines comportent un signal d'import mitochondrial à leur extrémité N-terminale, ce qui pose la question de l'existence de métabolismes inconnus dans les MLO de *Blastocystis* sp.

La séquence protéique du signal d'import située à l'extrémité N-terminale des protéines mitochondriales comporte des caractéristiques spécifiques mais néanmoins conservées. La longueur de la séquence signale reconnue par le système d'import de la mitochondrie est généralement de 10 à 80 acides aminés, mais peut parfois atteindre 100 résidus (Chacinska *et al.*, 2009). Cette séquence est en général riche en acides aminés hydrophobes, hydroxylés, et chargés positivement (Hjort *et al.*, 2010), et comporte une arginine en position -10, -3, ou -2 par rapport au site de clivage. Ces propriétés sont communes aux pré-séquences hydrogénosomales des protéines de *Trichomonas vaginalis*, bien que celles-ci soient plus courtes (4 à 21 acides aminés) (Carlton *et al.*, 2007). Les protéines potentiellement adressées aux MLOs de *Blastocystis* sp. présentent des peptides signaux d'une taille comprise entre 10 et 105 résidus, avec une taille moyenne de 35. Ces séquences sont également riches en acides aminés hydrophobes, hydroxylés, et chargés positivement, et présentent toutes une arginine en position -10, -3, ou -2 en amont du site de clivage. Les signaux d'import utilisés par *Blastocystis* sp. pour l'adressage des protéines aux MLOs semblent donc typiquement mitochondriaux.

La séquence signale des protéines destinées à être importées à la mitochondrie forme une structure particulière, en hélice  $\alpha$  amphipatique, présentant une surface hydrophobe et une surface chargée positivement. Cette conformation est essentielle pour la reconnaissance du précurseur protéique par le complexe de translocation de la membrane





**Figure 38. Reconstruction *in silico* du métabolisme des MLOs de *Blastocystis sp.***

L'ensemble des protéines figurant sur ce schéma ont été prédites par l'utilisation des algorithmes MitoProt et MITOPRED. Les protéines comportant un signal d'import mitochondrial prédit sont entourées en noir, les complexes protéiques pour lesquels seulement certaines sous-unités présentent un signal d'import sont entourés en pointillés. En violet : (1) décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH), la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (PFO), ou la pyruvate:NADP<sup>+</sup> oxydoréductase (PNO), (2) l'acétyl-CoA est converti en acétate par une acétate:succinate-CoA transférase (ASCT), (3) production d'ATP réalisée par une succinyl-CoA synthétase (SCS). Le pyruvate peut également être métabolisé en fumarate grâce à aux enzymes pyruvate carboxylase (PyC), malate déshydrogénase (MDH) et fumarase (FUM). Le fumarate constitue ensuite l'accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire du MLO (système NADH-fumarate réductase), conduisant à une production de succinate. En vert : métabolisme des acides aminés. En bordeaux : β-oxydation et biosynthèse de type II des acides gras. En bleu : métabolisme de l'assemblage des centres Fer/Soufre. En orange : système mitochondrial d'import des protéines. En rose : enzymes pouvant jouer un rôle dans la protection de l'organite contre le stress oxydant (superoxyde dismutase (SOD), glutathion réductase (GR), glutathion peroxydase (GPx)). Le rôle de l'oxydase alternative (AOX) et du complexe glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) reste à déterminer. Abréviations : 1, acétyl-CoA carboxylase; 2, 3-oxoacyl-ACP synthétase; 3, 3-oxoacyl-ACP réductase; 4, 2-énoyl-ACP réductase; 5, méthylmalonyl-CoA mutase; 6, méthylmalonyl-CoA épimérase; 7, propionyl-CoA carboxylase; AAC, transporteur ADP/ATP ; ACP, acyl carrier protein; ALAT, alanine aminotransférase; BC-AAT, aminotransférase des acides aminés à chaîne ramifiée; C I, complexe I; ECH, énoyl-CoA hydratase; [Fe]-Hyd, hydrogénase à fer; FRD, fumarate réductase (complexe II); HCDH, 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase; HICH, 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase; HID, 3-hydroxyisobutyrate déshydrogénase; LC-ACS, acyl-CoA synthétase; OMC, oxoglutarate/malate carrier protein; QH<sub>2</sub>, quinone réduite (dont la nature reste à déterminer).

externe (complexe TOM), responsable de l'import de la protéine à travers la membrane externe (Moberg *et al.*, 2004). La charge globale positive de la séquence signal, assistée par le potentiel transmembranaire de la membrane mitochondriale, est une propriété indispensable pour le transit du précurseur protéique à travers la membrane interne, réalisée par le complexe de translocation de la membrane interne (complexe TIM) (Shariff *et al.*, 2004). La machinerie d'import des protéines utilisée par la mitochondrie est un système composé de complexes protéiques extrêmement sophistiqués. Les complexes TOM et TIM fonctionnent en effet en étroite collaboration avec le complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery), responsable de l'insertion des protéines dans la membrane externe, le complexe MIA (Mitochondrial Intermembrane space Assembly), dirigeant les protéines vers l'espace intermembranaire, et le complexe OXA (insertase/export machinery of the inner membrane), chargé d'insérer les protéines importées dans la membrane interne (Chacinska *et al.*, 2009; Hjort *et al.*, 2010). Nous avons retrouvé dans le protéome de *Blastocystis* sp. 15 protéines impliquées dans ces différents complexes, telles que les protéines chaperonnes Hsp70, Cpn60, Hsp78, ces dernières comportant elles aussi un signal d'import mitochondrial (Figure 38 ; Chapitre IV Annexe 2). Les deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la peptidase mitochondriale (MPP) responsable du clivage de la séquence d'import du précurseur protéique lors de son entrée dans la matrice, ont également été identifiées.

### **Les MLOs de *Blastocystis* sp. renferment des protéines caractéristiques des hydrogénosomes**

L'ensemble des organismes eucaryotes connus à ce jour comportent des organites à double membrane, identifiés comme étant soit des mitochondries, soit des organites apparentés aux mitochondries (Embley and Martin, 2006). Ces derniers, rencontrés principalement chez des protistes et champignons anaérobies, sont typiquement classés en deux catégories : les hydrogénosomes, capables de produire de l'ATP par phosphorylation au niveau du substrat, et les mitosomes, qui n'ont pas de rôle dans la production d'énergie. Le



métabolisme énergétique anaérobie de ces organismes est caractérisé par deux enzymes clefs, la PFOR, qui réalise la décarboxylation du pyruvate et acétyl-CoA, et l'hydrogénase à fer, responsable de la production d'hydrogène (Hjort *et al.*, 2010; Shiflett and Johnson, 2010). Ces enzymes sont localisées soit dans les hydrogénosomes, pour les protistes et champignons comportant ce type d'organites (*Trichomonas vaginalis*, *Neocallimastix* sp.), soit dans le cytoplasme des organismes présentant des mitosomes tels que *Giardia* sp., et *Entamoeba* sp.

Nous avons pu identifier ces deux enzymes hydrogénomales dans les protéines potentiellement importées aux MLOs de *Blastocystis* sp. (Figure 38). Celles-ci comportent en effet un signal d'import à la mitochondrie. Ces prédictions sont de plus confirmées par nos résultats expérimentaux antérieurs, qui montraient, à l'aide d'anticorps spécifiques, une localisation de ces deux protéines dans la matrice des MLOs (Wawrzyniak *et al.*, 2008). Toutefois, aucune preuve directe d'une production d'hydrogène n'a pu être mise en évidence. Ce résultat n'est peut être pas lié à l'absence d'activité, mais tout simplement à la trop faible sensibilité de la méthode utilisée (Lantsman *et al.*, 2008). Une méthode par spectrométrie de masse a par exemple été nécessaire pour la mise en évidence de la production d'hydrogène cytoplasmique chez *Giardia* sp., qui est dix fois plus faible que celle décelée chez *Trichomonas* sp. (Hjort *et al.*, 2010).

### **Les MLOs de *Blastocystis* sp. comportent également des éléments du métabolisme énergétique des mitochondries**

Nous avons précédemment décrit la présence d'un génome circulaire typiquement mitochondrial dans la matrice des MLOs, codant notamment pour la machinerie de traduction et pour certaines sous-unités du complexe I mitochondrial (Wawrzyniak *et al.*, 2008). Grâce aux données recueillies par la prédiction du protéome de ces organites, il semble que les MLOs présentent de nombreux éléments caractéristiques du métabolisme énergétique des mitochondries. Nos analyses révèlent en effet la présence de l'intégralité



des sous-unités E1 ( $\alpha$  et  $\beta$ ), E2, et E3 du complexe PDH mitochondrial, les sous-unités E1 et E2 comportant un signal d'import mitochondrial à leur extrémité N-terminale. Nous avons également identifié une Pyruvate:NADP<sup>+</sup> oxydoréductase (PNO), qui est une enzyme résultant de la fusion entre un domaine PFOR et une cytochrome P450 réductase. Les MLOs de *Blastocystis* sp. peuvent donc théoriquement utiliser trois voies biochimiques différentes pour la production d'acétyl-CoA à partir de pyruvate, supportée par la présence du complexe PDH, de la PFOR et de la PNO. *Euglena* sp. et *Chlamydomonas* sp. sont les seuls eucaryotes connus pour contenir ces 3 types d'enzymes. Le complexe PDH est utilisé en conditions aérobie, alors que le système PFOR/PNO fonctionne en conditions anaérobies, permettant à ces organismes d'adapter leur métabolisme à la quantité d'oxygène présente dans leur environnement (Hoffmeister *et al.*, 2004). L'utilisation d'un tel mécanisme d'adaptation par *Blastocystis* sp. semble néanmoins surprenante compte tenu de son caractère anaérobie.

En plus des 10 sous-unités du complexe I codées par le génome circulaire des MLOs, nous avons identifié 10 sous-unités supplémentaires dont les gènes sont portés par le génome nucléaire, conduisant à un complexe I mitochondrial composé au total de 20 sous-unités. A titre de comparaison, le complexe I chez l'homme est composé de 42 sous-unités (Taylor *et al.*, 2003). Nous avons de plus mis en évidence les 4 sous-unités du complexe II, chacune comportant un signal d'import de type mitochondrial (Chapitre IV Annexe 2). Néanmoins, aucun gène codant les sous-unités des complexes III et IV n'a été identifié, démontrant l'existence d'une chaîne respiratoire tronquée chez *Blastocystis* sp. Par conséquent, il est probable que le potentiel transmembranaire des MLOs, mis en évidence par l'utilisation de MitoTracker ou de Rhodamine 123, provienne de la seule activité de pompe à protons du complexe I (Nasirudeen and Tan, 2004; Stechmann *et al.*, 2008). Le complexe II des mitochondries aérobies présente une activité succinate déshydrogénase (SDH), et catalyse la réaction d'oxydation du succinate en fumarate du cycle de Krebs. Curieusement, nous n'avons identifié qu'une partie des enzymes du cycle de Krebs, dans lequel le succinyl-CoA est métabolisé en oxaloacétate, grâce à l'activité successive des



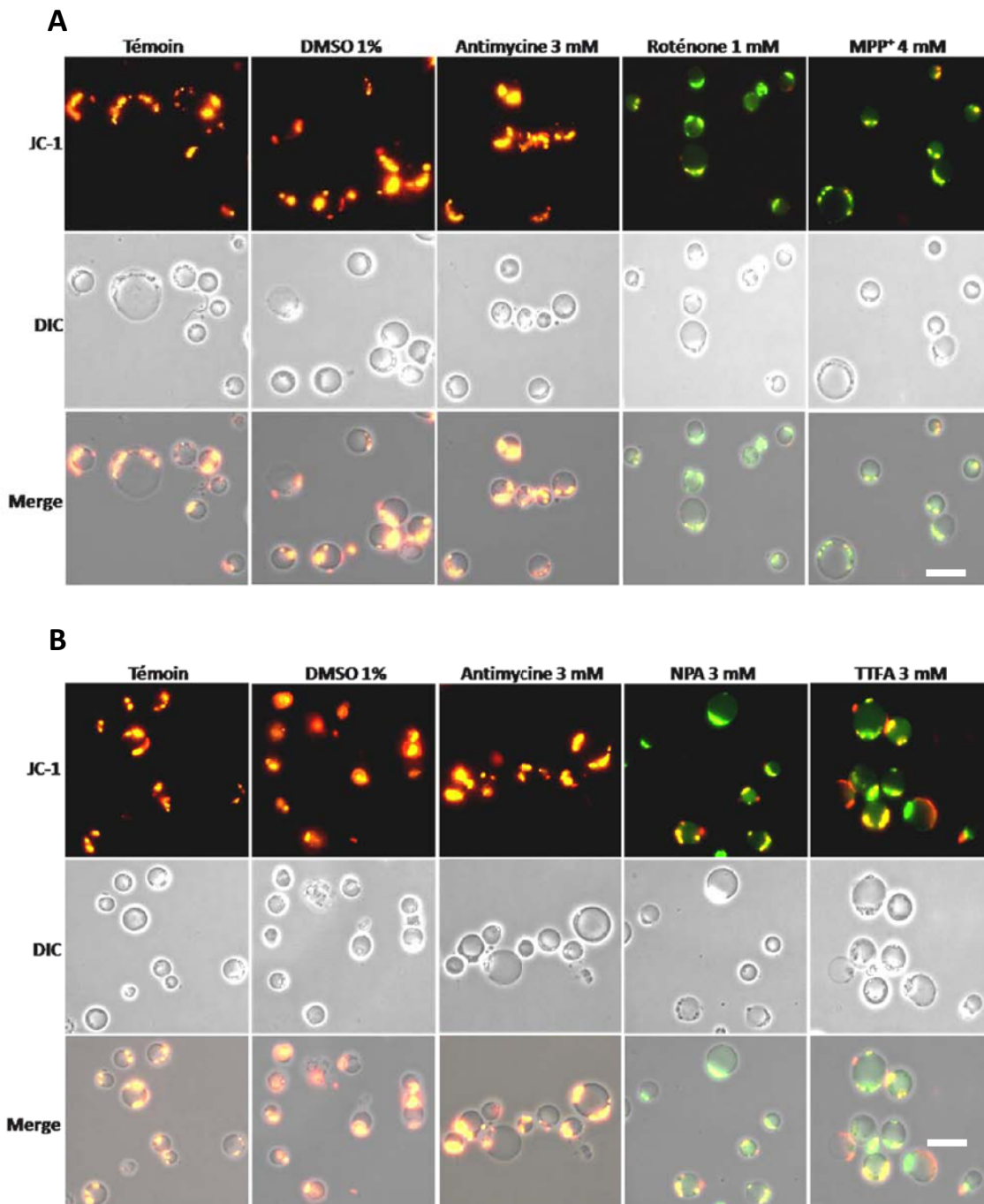
enzymes succinyl-CoA synthétase, succinate déshydrogénase (complexe II SDH), fumarate hydratase, et malate déshydrogénase (Figure 38).

Dans le cas de la mitochondrie anaérobie, retrouvée chez certains helminthes parasites (*Fasciola hepatica*, *Ascaris suum*), ces enzymes effectuent les réactions inverses. Dans ce type de métabolisme anaérobie, le complexe II fonctionne dans le sens inverse, et présente une activité fumarate réductase (FRD). La chaîne de transporteurs d'électrons est ainsi très différente de celle rencontrée en aérobiose, et se résume aux complexes I et II. Le complexe I fournit ainsi les électrons (provenant de l'oxydation du NADH) au complexe II, qui sont nécessaires à la réduction du fumarate en succinate. Le transit des électrons entre les deux complexes est réalisé non pas par une ubiquinone (utilisée en aérobiose), mais par une rhodoquinone. Cette chaîne respiratoire particulière, induisant la production d'un gradient électrochimique par l'activité de pompe à protons du complexe I, est également connue sous le nom de système NADH-fumarate réductase (Tielens *et al.*, 2002). Ce système est également présent dans l'hydrogénosome de *Nyctotherus ovalis*, qui utilise le fumarate comme accepteur final d'électrons conduisant à la production de succinate. Il est également intéressant de noter que les complexes III et IV sont absents de l'organite de *N. ovalis* (Boxma *et al.*, 2005; de Graaf *et al.*, 2011).

De la même manière, la présence dans les MLOs de *Blastocystis* sp. d'une chaîne respiratoire uniquement composée des complexes I et II suggère fortement l'existence d'un tel système, le complexe II acceptant les électrons du complexe I pour la réduction du fumarate en succinate. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à l'incubation de cellules de *Blastocystis* sp. en présence d'inhibiteurs spécifiques du complexe I (roténone, 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)) et du complexe II (acide 3-nitropropionique (3-NPA), 2-thénoyltrifluoroacétone (TTFA)), dans le but d'observer un éventuel changement du potentiel transmembranaire des MLOs.

Nous avons pour cela utilisé un marqueur dépendant de l'intensité du gradient électrochimique membranaire mitochondrial (JC-1, Invitrogen), qui présente une

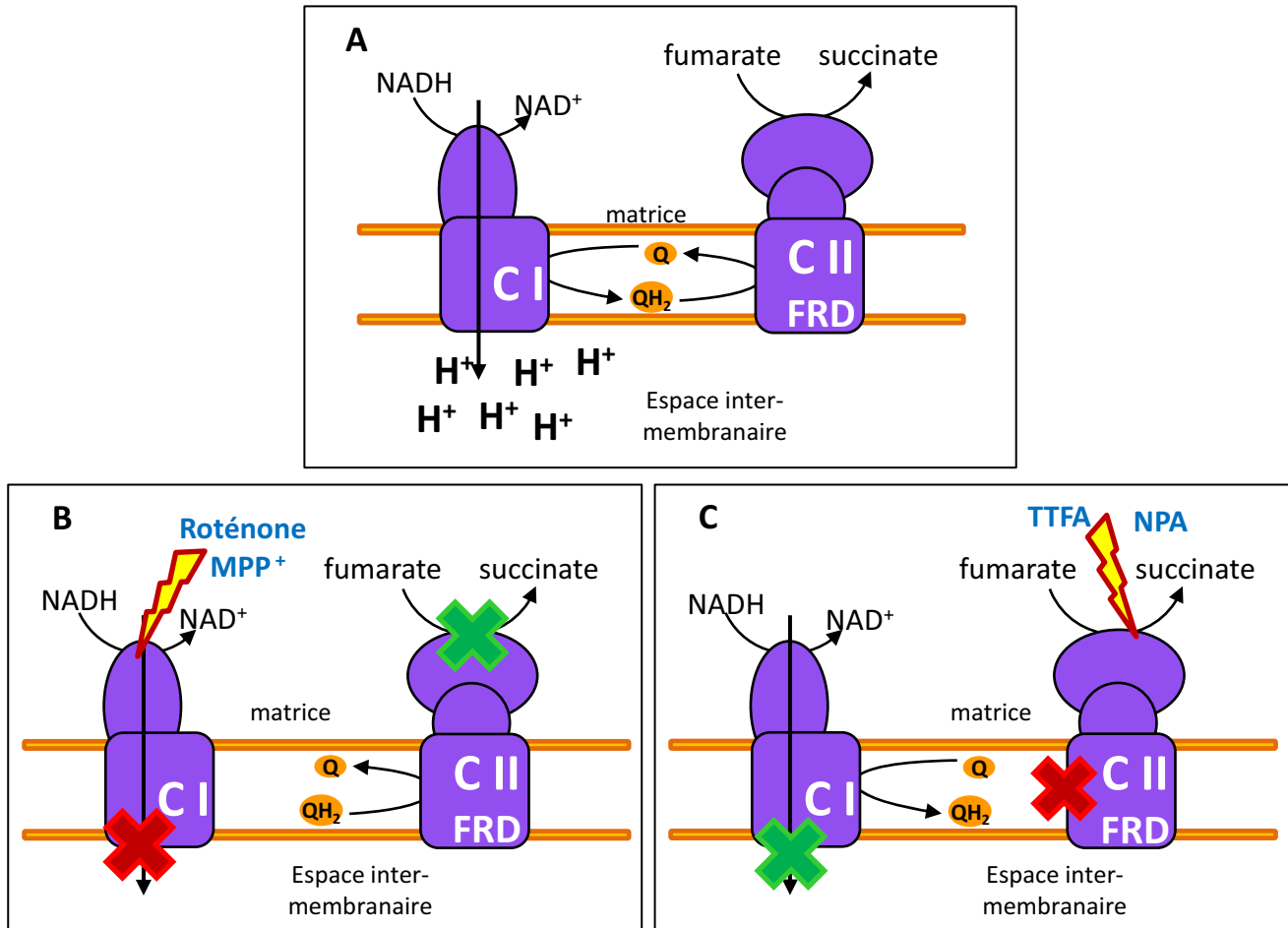




**Figure 39. Le potentiel transmembranaire des MLOs de *Blastocystis* sp. est dépendant de l'activité des complexes I et II.** Le JC-1 est un marqueur dépendant de l'intensité du gradient électrochimique membranaire mitochondrial, qui présente une fluorescence orange en présence d'un fort potentiel transmembranaire, et une fluorescence verte lorsque celui-ci décline. (A) L'utilisation d'inhibiteurs du complexe I mitochondrial (roténone, MPP<sup>+</sup>) conduit à une fluorescence verte, témoignant d'une diminution du potentiel transmembranaire des MLOs. (B) L'utilisation d'inhibiteurs du complexe II mitochondrial (NPA, TTFA) entraîne également l'apparition d'une fluorescence verte, attestant du déclin du potentiel électrochimique membranaire des MLOs. Noter l'absence d'effet de l'antimycine A (un inhibiteur du complexe III) sur le potentiel transmembranaire de ces organites (fluorescence orange), confirmant nos données génomiques quant à l'absence du complexe III. La présence de DMSO 1% (qui est la concentration finale de ce composé lors de l'ajout des inhibiteurs), n'a aucun effet sur le potentiel transmembranaire des MLOs (fluorescence orange). Echelle : 20 µm.

fluorescence orange en présence d'un fort potentiel transmembranaire, et une fluorescence verte lorsque celui-ci décline. Comme nous le voyons sur la Figure 39A, l'incubation du parasite en présence de roténone ou de MPP<sup>+</sup> conduit à une annulation du potentiel transmembranaire. Il est également intéressant de noter que l'antimycine A (un inhibiteur du complexe III), n'a aucun effet sur le potentiel transmembranaire des MLOs, confirmant nos données génomiques quant à l'absence du complexe III. Une diminution du potentiel transmembranaire est également observée lors de l'utilisation du 3-NPA et du TTFA, deux inhibiteurs du complexe II mitochondrial (Figure 39B). Le fonctionnement du complexe II (qui ne comporte pas d'activité de pompe à protons) est donc également lié à la création du potentiel transmembranaire des MLOs. Ces données expérimentales justifient par conséquent que le fonctionnement du complexe I, responsable de la création du gradient électrochimique, est dépendant de l'activité du complexe II (Figure 40), ce qui est également le cas dans le système NADH-fumarate réductase des mitochondries anaérobies et de la mitochondrie modifiée de *N. ovalis*. Il semblerait donc que les MLOs de *Blastocystis* sp. comportent également un système NADH-fumarate réductase. La preuve ultime de l'existence d'un tel métabolisme consisterait à mettre en évidence la nature de la quinone présente dans les MLOs. Le système NADH-fumarate réductase utilise en effet une rhodoquinone, et non une ubiquinone, pour le transit des électrons entre le complexe I et le complexe II.

Chez les mitochondries anaérobies, le gradient électrochimique fourni par ce système est ensuite utilisé par l'ATP synthase pour la production d'ATP (Tielens *et al.*, 2002). Néanmoins, aucun gène codant les sous-unités du complexe ATP synthase n'a été identifié dans le génome de *Blastocystis* sp., posant ainsi la question du devenir du gradient électrochimique créé par le complexe I. La production d'ATP par les MLOs de *Blastocystis* sp. ne proviendrait donc pas d'une ATP synthase. Nous avons néanmoins identifié une acétate:succinate-CoA transférase (ASCT) et une succinyl-CoA synthase (SCS), présentant un signal d'import mitochondrial (Chapitre IV Annexe 2). Ces deux enzymes, présentes à la fois dans les mitochondries anaérobies et les hydrogénosomes, sont en effet capables de



**Figure 40. Représentation schématique du fonctionnement potentiel des complexes I et II dans les MLOs de *Blastocystis sp.*** (A) Chaîne respiratoire composée des complexes I et II, fonctionnant de manière similaire au système NADH-fumarate réductase des mitochondries anaérobies. Le complexe I fournit les électrons (provenant de l'oxydation du NADH) au complexe II par l'intermédiaire d'une quinone, permettant à celui-ci de réduire le fumarate en succinate grâce à son activité fumarate réductase. L'activité de pompe à protons du complexe I conduit à la production d'un potentiel protonique électrochimique. (B) L'utilisation d'inhibiteurs du complexe I (roténone, MPP<sup>+</sup>) entraîne un blocage de la réduction de la quinone par ce complexe, conduisant à l'arrêt de son activité de pompe à protons et par conséquent de la création du potentiel transmembranaire des MLOs (croix rouge). Les électrons ne pouvant pas être transférés au complexe II, l'activité de fumarate réductase de celui-ci sera également compromise (croix verte). (C) L'utilisation d'inhibiteurs du complexe II (NPA, TTFA) entraîne un blocage de l'oxydation de la quinone par le complexe II (croix rouge). L'absence de la forme oxydée de la quinone, nécessaire au fonctionnement du complexe I, entraîne donc une inhibition de l'activité NADH déshydrogénase et de pompe à protons de ce dernier, aboutissant à un déclin du potentiel transmembranaire des MLOs (croix verte). Abréviations : C I, complexe I; C II FRD, complexe II de type fumarate réductase; Q, quinone oxydée; QH<sub>2</sub>, quinone réduite.

produire de l'énergie sous forme d'ATP, par un phénomène de phosphorylation au niveau du substrat (Tielens *et al.*, 2002). Cette voie biochimique constitue, pour les hydrogénosomes, la seule voie de production d'ATP (Muller, 1993). De la même manière, les MLOs de *Blastocystis* sp. pourraient donc produire de l'ATP grâce à l'activité de ces deux protéines (Figure 38).

### **Les organites de *Blastocystis* sp. présentent aussi d'autres métabolismes essentiels caractéristiques de la mitochondrie**

Une des fonctions essentielles de la mitochondrie est l'assemblage des protéines à centres Fe/S (Lill *et al.*, 1999), métabolisme qui est également conservé chez les hydrogénosomes et les mitosomes (van der Giezen and Tovar, 2005). Nous avons identifié 11 protéines (dont 6 comportent un signal d'import en N-terminal) impliquées dans le système ISC (Iron-Sulfur Cluster) mitochondrial, dont la cystéine désulfurase Nfs1, la protéine d'assemblage Isu1, la frataxine, ou encore la NTPase (Nucléoside-Triphosphatase) Ind1, nécessaire à l'assemblage de certaines sous-unités du complexe I (Lill, 2009). Les MLOs de *Blastocystis* sp. semblent également être engagés dans d'autres métabolismes caractéristiques des mitochondries, comme la synthèse de type II et la  $\beta$ -oxydation des acides gras, ou le métabolisme de certains acides aminés (valine, alanine). Des enzymes impliquées dans le système de défense contre le stress oxydant, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx), et la glutathion réductase (GR) ont également été mises en évidence (Figure 38).

Enfin, nous avons identifié une oxydase alternative (AOX), présentant un signal d'import mitochondrial (Chapitre IV Annexe 2). Cette enzyme, qui catalyse la réaction de réduction de l'oxygène en eau, pourrait aussi participer à la protection du parasite contre le stress oxydatif, comme cela a été suggéré pour *Cryptosporidium parvum* (Henriquez *et al.*, 2005; Putignani *et al.*, 2004).



## Conclusion

La prédiction du protéome complet des MLOs de *Blastocystis* sp. nous montre que ces organites partagent de nombreuses caractéristiques avec les mitochondries, comme la présence de signaux d'import typiquement mitochondriaux à l'extrémité N-terminale des protéines, et l'existence d'un système d'import analogue. Ils sont également impliqués dans de nombreux métabolismes caractéristiques des mitochondries, tels que l'assemblage des centres Fe/S, la  $\beta$ -oxydation et la synthèse de type II des acides gras, le métabolisme de certains acides aminés, ou encore le système de défense contre le stress oxydant. Les MLOs présentent aussi un métabolisme très similaire aux mitochondries anaérobies et à l'hydrogénosome de *N. ovalis*. Ils comportent en effet une chaîne de transporteurs d'électrons, composée uniquement des complexes I et II, fonctionnant vraisemblablement comme un système NADH-fumarate réductase, bien que celui-ci ne soit apparemment pas lié à la production d'ATP, en raison de l'absence de sous-unité de l'ATP synthase.

Les MLOs comportent néanmoins des enzymes caractéristiques des hydrogénosomes impliquées dans la décarboxylation du pyruvate et la production d'ATP (hydrogénase à fer, PFOR, ASCT, SCS), même si aucune production d'hydrogène n'a pu être mise en évidence jusqu'ici. Ces organites présentent donc des caractéristiques métaboliques typiques des mitochondries aérobies et anaérobies, mais aussi des hydrogénosomes. Les MLOs de *Blastocystis* sp. et les organites de *N. ovalis* nous dévoilent donc que notre « catégorisation » conduisant à séparer la mitochondrie de l'hydrogénosome est obsolète, et révèlent plutôt un continuum évolutif des fonctions métaboliques des mitochondries et des organites apparentés, conduisant à une adaptation accrue des organismes à leur environnement.



## Références

- Adams, K.L., and Palmer, J.D. (2003) Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol* **29**: 380-395.
- Barbera, M.J., Ruiz-Trillo, I., Tufts, J.Y., Bery, A., Silberman, J.D., and Roger, A.J. (2010) *Sawyeria marylandensis* (Heterolobosea) Has a Hydrogenosome with Novel Metabolic Properties. *Eukaryot Cell* **9**: 1913-1924.
- Berger, J., and Lynn, D.H. (1992) Hydrogenosome-methanogen assemblages in the echinoid endocommensal plagiopylid ciliates *Lechriopyla mystax* Lynch, 1930, and *Plagiopyla minuta* Powers, 1933. *J. Protozool.* **39**: 4-8.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2008) Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* **9**: 42-49.
- Boxma, B., de Graaf, R.M., van der Staay, G.W., van Alen, T.A., Ricard, G., Gabaldon, T., van Hoek, A.H., Moon-van der Staay, S.Y., Koopman, W.J., van Hellemond, J.J., Tielens, A.G., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M.A., and Hackstein, J.H. (2005) An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* **434**: 74-79.
- Bui, E.T., Bradley, P.J., and Johnson, P.J. (1996) A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9651-9656.
- Carlton, J.M., Hirt, R.P., Silva, J.C., Delcher, A.L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J.R., Bidwell, S.L., Alsmark, U.C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C.J., Dacks, J.B., Foster, P.G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., Westrop, G.D., Muller, S., Dessi, D., Fiori, P.L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F.D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M.T., Hayes, R.D., Mukherjee, M., Okumura, C.Y., Schneider, R., Smith, A.J., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B.J., Perte, M., Feldblyum, T.V., Utterback, T.R., Shu, C.L., Osoegawa, K., de Jong, P.J., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, S.B., Logsdon, J.M., Jr., Henze, K., Gupta, A., Wang, C.C., Dunne, R.L., Upcroft, J.A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S.L., Tang, P., Chiu, C.H., Lee, Y.S., Embley, T.M., Coombs, G.H., Mottram, J.C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C.M., and Johnson, P.J. (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* **315**: 207-212.
- Cerkasovova, A., Lukasova, G., Cerkasov, J., and Kulda, J. (1973) Biochemical characterization of large granule fraction of *Tritrichomonas foetus* (strain KV1). *J. Protozool.* **20**: 525.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**: 628-644.
- Claros, M.G., and Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**: 779-786.
- de Graaf, R.M., Ricard, G., van Alen, T.A., Duarte, I., Dutilh, B.E., Burgdorf, C., Kuiper, J.W., van der Staay, G.W., Tielens, A.G., Huynen, M.A., and Hackstein, J.H. (2011) The organellar genome and metabolic potential of the hydrogen-producing mitochondrion of *Nyctotherus ovalis*. *Mol Biol Evol.*
- Denoeud, F., Roussel, M., Noel, B., Wawrzyniak, I., Da Silva, C., Diogon, M., Viscogliosi, E., Brochier-Armanet, C., Couloux, A., Poulain, J., Segurans, B., Anthouard, V., Texier, C., Blot, N., Poirier, P., Choo, N.G., Tan, K.S., Artiguenave, F., Jaillon, O., Aury, J.M., Delbac, F., Wincker, P., Vivares, C.P., and El Alaoui, H. (2011) Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol* **12**: R29.





- Dyall, S.D., Koehler, C.M., Delgadillo-Correa, M.G., Bradley, P.J., Plumper, E., Leuenberger, D., Turck, C.W., and Johnson, P.J. (2000) Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Mol Cell Biol* **20**: 2488-2497.
- Embley, T.M., and Martin, W. (2006) Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* **440**: 623-630.
- Gaston, D., Tsaousis, A.D., and Roger, A.J. (2009) Predicting proteomes of mitochondria and related organelles from genomic and expressed sequence tag data. *Methods Enzymol* **457**: 21-47.
- Gill, E.E., Diaz-Trivino, S., Barbera, M.J., Silberman, J.D., Stechmann, A., Gaston, D., Tamas, I., and Roger, A.J. (2007) Novel mitochondrion-related organelles in the anaerobic amoeba *Mastigamoeba balamuthi*. *Mol Microbiol* **66**: 1306-1320.
- Guda, C., Fahy, E., and Subramaniam, S. (2004) MITOPRED: a genome-scale method for prediction of nucleus-encoded mitochondrial proteins. *Bioinformatics* **20**: 1785-1794.
- Hackstein, J.H., Tjaden, J., and Huynen, M. (2006) Mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes: products of evolutionary tinkering! *Curr Genet* **50**: 225-245.
- Hampl, V., Silberman, J.D., Stechmann, A., Diaz-Trivino, S., Johnson, P.J., and Roger, A.J. (2008) Genetic evidence for a mitochondriate ancestry in the 'amitochondriate' flagellate *Trimastix pyriformis*. *PLoS One* **3**: e1383.
- Henriquez, F.L., Richards, T.A., Roberts, F., McLeod, R., and Roberts, C.W. (2005) The unusual mitochondrial compartment of *Cryptosporidium parvum*. *Trends Parasitol* **21**: 68-74.
- Hjort, K., Goldberg, A.V., Tsaousis, A.D., Hirt, R.P., and Embley, T.M. (2010) Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**: 713-727.
- Hoffmeister, M., van der Klei, A., Rotte, C., van Grinsven, K.W., van Hellemond, J.J., Henze, K., Tielens, A.G., and Martin, W. (2004) *Euglena gracilis* rhodoquinone:ubiquinone ratio and mitochondrial proteome differ under aerobic and anaerobic conditions. *J Biol Chem* **279**: 22422-22429.
- Hrady, I., Hirt, R.P., Dolezal, P., Bardonova, L., Foster, P.G., Tachezy, J., and Embley, T.M. (2004) *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* **432**: 618-622.
- Lantsman, Y., Tan, K.S., Morada, M., and Yarlett, N. (2008) Biochemical characterization of a mitochondrial-like organelle from *Blastocystis* sp. subtype 7. *Microbiology* **154**: 2757-2766.
- Lill, R., Diekert, K., Kaut, A., Lange, H., Pelzer, W., Prohl, C., and Kispal, G. (1999) The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem* **380**: 1157-1166.
- Lill, R. (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831-838.
- Lindmark, D.G., and Muller, M. (1973) Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem* **248**: 7724-7728.
- Lindmark, D.G., Muller, M., and Shio, H. (1975) Hydrogenosome in *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.* **63**: 552-554.
- Moberg, P., Nilsson, S., Stahl, A., Eriksson, A.C., Glaser, E., and Maler, L. (2004) NMR solution structure of the mitochondrial F1beta presequence from *Nicotiana plumbaginifolia*. *J Mol Biol* **336**: 1129-1140.



- Muller, M. (1993) The hydrogenosome. *J Gen Microbiol* **139**: 2879-2889.
- Nasirudeen, A.M., and Tan, K.S. (2004) Isolation and characterization of the mitochondrion-like organelle from *Blastocystis hominis*. *J Microbiol Methods* **58**: 101-109.
- Paul, R.G., Williams, A.G., and Butler, R.D. (1990) Hydrogenosomes in the rumen entodiniomorphid ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *J Gen Microbiol* **136**: 1981-1989.
- Perez-Brocal, V., and Clark, C.G. (2008) Analysis of two genomes from the mitochondrion-like organelle of the intestinal parasite *Blastocystis*: complete sequences, gene content, and genome organization. *Mol Biol Evol* **25**: 2475-2482.
- Putignani, L., Tait, A., Smith, H.V., Horner, D., Tovar, J., Tetley, L., and Wastling, J.M. (2004) Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology* **129**: 1-18.
- Shariff, K., Ghosal, S., and Matouschek, A. (2004) The force exerted by the membrane potential during protein import into the mitochondrial matrix. *Biophys J* **86**: 3647-3652.
- Shiflett, A.M., and Johnson, P.J. (2010) Mitochondrion-related organelles in eukaryotic protists. *Annu Rev Microbiol* **64**: 409-429.
- Stechmann, A., Hamblin, K., Perez-Brocal, V., Gaston, D., Richmond, G.S., van der Giezen, M., Clark, C.G., and Roger, A.J. (2008) Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Biol* **18**: 580-585.
- Sutak, R., Chamot, C., Tachezy, J., Camadro, J.M., and Lesuisse, E. (2004) Siderophore and haem iron use by *Trichomonas foetus*. *Microbiology* **150**: 3979-3987.
- Taylor, S.W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G.M., Warnock, D.E., Wiley, S., Murphy, A.N., Gaucher, S.P., Capaldi, R.A., Gibson, B.W., and Ghosh, S.S. (2003) Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol* **21**: 281-286.
- Tielens, A.G., and Van Hellemond, J.J. (1998) The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1365**: 71-78.
- Tielens, A.G., Rotte, C., van Hellemond, J.J., and Martin, W. (2002) Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem Sci* **27**: 564-572.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., and Martin, W. (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* **5**: 123-135.
- van der Giezen, M., and Tovar, J. (2005) Degenerate mitochondria. *EMBO Rep* **6**: 525-530.
- Wawrzyniak, I., Roussel, M., Diogon, M., Couloux, A., Texier, C., Tan, K.S., Vivares, C.P., Delbac, F., Wincker, P., and El Alaoui, H. (2008) Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis hominis*. *Int J Parasitol* **38**: 1377-1382.
- Yarlett, N., Orpin, C.G., Munn, E.A., Yarlett, N.C., and Greenwood, C.A. (1986) Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem J* **236**: 729-739.



# **Chapitre III**

## **Conclusion et perspectives**

*« Les machines un jour pourront résoudre tous les problèmes, mais jamais aucune d'entre elles ne pourra en poser un! »*

*Albert Einstein*

	Number	Mean length	Median length	Percentage of genome (18.8 Mb)
Genes	6,020	1,299	1,397	42%
Exons	24,580	280	150	37%
Introns	18,560	50.5	31	5%
Intergenic	-	1,801	4,092	58%
Repeats	2,730	1,747	2,862	25%

**Tableau 4. Caractéristiques générales du génome de *Blastocystis* sp. sous-type 7 (ST7)**

*Modifié d'après Denoeud et al., 2011*

## I. Propriétés du génome de *Blastocystis* sp. ST7

### A. Caractéristiques générales

Les analyses caryotypiques en champ pulsé (PFGE) de l'ADN de *Blastocystis* sp. indiquent la présence de 15 bandes chromosomiques. Les résultats d'assemblage des différentes séquences obtenues lors du séquençage de ce straménopile aboutissent à 54 scaffolds, dont deux pourraient correspondre à des chromosomes entiers (scaffolds 6 et 9). Ces données conduisent à un génome de 18,8 Mpb, qui est une taille relativement petite par rapport aux génomes de straménopiles parasites de plantes (*Phytophthora infestans*, 240 Mpb ; *P. sojae*, 95 Mpb ; *P. ramorum*, 65 Mpb), ou de straménopiles libres (*Phaeodactylum tricornutum*, 27,4 Mpb ; *Thalassiosira pseudonana*, 34,5 Mpb). La petite taille du génome de *Blastocystis* sp. est notamment reflétée par de courtes régions intergéniques (d'une taille moyenne de 1 801 pb), un pourcentage relativement faible de séquences répétées (25%), et des introns ne dépassant pas 31 nucléotides (Tableau 4).

Les données d'annotation révèlent la présence de 6 020 gènes (Tableau 4), couvrant 42% du génome total. Ce nombre de gènes est beaucoup plus faible que celui rencontré dans le génome d'autres straménopiles, tels que *P. infestans* (17 797), *P. sojae* (19 027) ou *T. pseudonana* (11 776). Le génome de *Blastocystis* sp. semble comporter 38 unités d'ADN ribosomal, organisées en unités transcriptionnelles, chacune étant composée des gènes codant pour les ARN 18S, 5,8S et 28S. Il est également à noter que l'alignement des gènes complets de l'ARNr des petites et grandes sous-unités révèle un polymorphisme important entre les copies. Cette donnée est à la fois intéressante et inquiétante, lorsque l'on sait que le génotypage de *Blastocystis* sp. est à l'heure actuelle majoritairement réalisé à partir du séquençage du gène de l'ARNr 18S. La recherche de nouveaux marqueurs permettant le génotypage des souches de *Blastocystis* sp. serait donc à envisager. Nous travaillons actuellement en ce sens en analysant d'autres gènes marqueurs, présents notamment sur le génome circulaire des MLOs.





## B. Duplications et réarrangements

De manière surprenante, le génome de *Blastocystis* sp. comporte 1 141 gènes paralogues, ce qui représente 19% des gènes, témoignant probablement d'un phénomène de duplication. Nous avons en ce sens identifié 320 blocs de gènes dupliqués, couvrant 39% du génome. Ces blocs correspondent à des segments paralogues de plusieurs gènes adjacents, certains pouvant atteindre une taille de plus de 100 kpb, suggérant une duplication complète du génome. Les scaffolds obtenus à l'issue de l'étape d'assemblage présentent une multitude de segments homologues à plusieurs autres scaffolds. Néanmoins, les scaffolds ne sont pas homologues deux à deux comme nous pourrions le penser dans le cas d'une duplication récente du génome. La comparaison des copies paralogues révèle un pourcentage d'identité nucléotidique très élevée (99% pour les régions codantes). Celui-ci est de plus homogène pour l'ensemble des blocs paralogues, suggérant que tous ces blocs auraient été dupliqués au même moment.

Deux hypothèses pourraient expliquer l'origine de ces segments paralogues. La première consiste à dire que ces duplications auraient pour origine une duplication récente du génome (expliquée par une identité quasi parfaite des copies) qui aurait été suivie de réarrangements rapides. Un fort taux de réarrangements dans le génome de *Blastocystis* sp. pourrait également expliquer la raison pour laquelle nous retrouvons très peu de syntenie entre ce génome et ceux des autres straménopiles. La seconde hypothèse est que les duplications proviendraient d'un phénomène de duplications de segments génomiques, favorisé par un taux de réarrangements élevé. Toutefois, l'homogénéité de l'identité de séquence observée entre les copies paralogues est plutôt le reflet d'un événement unique, et cette hypothèse sous-entend l'existence d'une multitude de duplications qui se seraient réalisées pendant une courte période évolutive, ou d'un taux très élevé de recombinaisons. Nous voyons que la caractéristique commune à ces deux hypothèses réside dans le fait que le génome de *Blastocystis* sp. semble présenter un taux élevé de réarrangements, ce qui fait qu'il est difficile de déterminer quel scénario est le plus probable. Il serait donc intéressant de procéder à des analyses de génomiques comparatives à partir du génome d'autres sous-



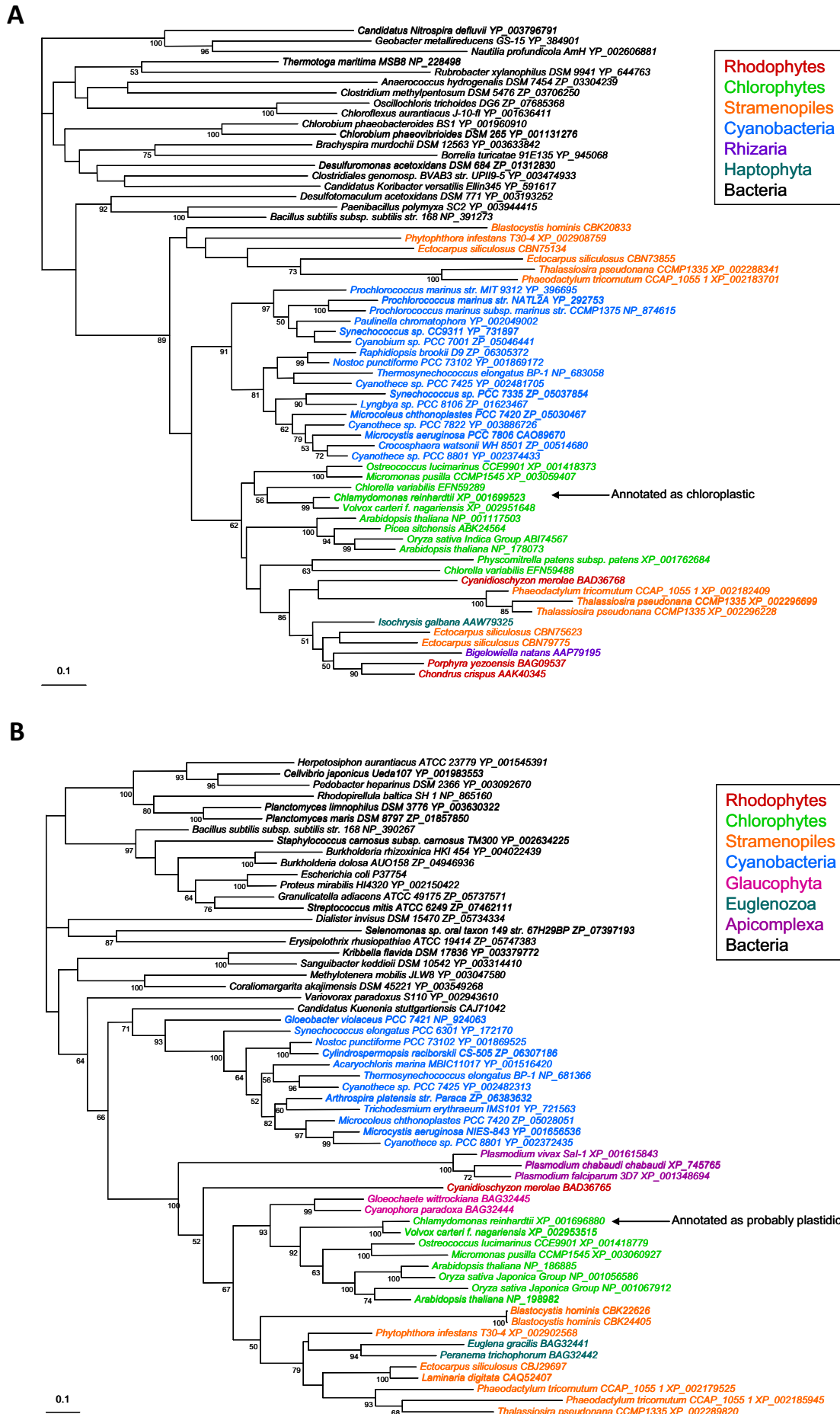
types de *Blastocystis* sp., afin de déterminer si le profil de duplication des gènes et le taux élevé de réarrangements observés pour le sous-type 7 sont des caractéristiques du genre *Blastocystis*, ou propres au sous-type 7. Afin de répondre à ces questions, nous avons récemment initié un projet de génomique comparative en collaboration avec l'Institut Pasteur de Lille et la société Genoscreen. Les génomes de quatre autres sous-types (ST1, ST4, ST6 et ST8) seront donc prochainement séquencés.

## **C. Acquisition de gènes par transfert horizontal et reliques endosymbiotiques**

### **C.1 Pour une meilleure adaptation à l'environnement intestinal**

Le processus de transfert horizontal de gènes est un phénomène essentiel dans les mécanismes d'adaptation des organismes aux différentes niches écologiques (Keeling and Palmer, 2008), et joue un rôle important chez les straménopiles. Par exemple, l'acquisition par transfert horizontal du gène bactérien codant pour la ferritine chez les diatomées, à permis à ces organismes d'améliorer leur capacité à capter le fer, qui est un nutriment en quantité limité dans l'environnement (eaux de surface) dans lequel vivent ces straménopiles. L'exemple marquant est celui de la diatomée *Phaeodactylum*, pour laquelle le métabolisme de l'azote, les processus de réparation de l'ADN, et le pouvoir de silicification sont issus de transferts horizontaux de gènes (Bowler *et al.*, 2008; Keeling, 2009).

Les données d'annotation du génome de *Blastocystis* sp. ont permis de repérer 133 gènes présentant des homologues de séquence avec des gènes bactériens et archaébactériens, potentiellement acquis par transfert horizontal. Nos analyses phylogénétiques confirment l'origine bactérienne de ces gènes, mais ne permettent pas d'identifier précisément le donneur, suggérant que ces phénomènes de transferts horizontaux sont anciens, ou que ces gènes ont rapidement évolué dans le génome de *Blastocystis* sp. Il est intéressant de noter que certains gènes, comportant pourtant une



origine phylogénétique bactérienne, présentent de fortes homologues avec des gènes retrouvés chez des organismes eucaryotes pathogènes et/ou anaérobies (*Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *Aspergillus fumigatus*, *Perkinsus marinus*). Cette observation conduit à penser que les processus de transferts horizontaux de gènes n'ont pas eu lieu uniquement entre des bactéries et des eucaryotes, mais également entre eucaryotes (pour plus de détails, voir Figure S6 ; <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/gb-2011-12-3-r29-S1.DOC>).

Ces gènes codent notamment pour des transporteurs membranaires de type MFS (Major Facilitator Transporter), responsables du transport d'une grande variété de substrats, tels que des ions, des sucres, des drogues, ou des acides aminés (Law *et al.*, 2008), et pour certaines enzymes intervenant dans les métabolismes de type fermentaire (alcool déshydrogénase). Ceci a également été observé chez les eucaryotes pathogènes *Giardia intestinalis* et *E. histolytica* (Nixon *et al.*, 2002). Nous avons aussi identifié des gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans les processus d'adhésion (pour plus de détails, voir Tableau S3 ; <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/gb-2011-12-3-r29-S2.PDF>). La raison pour laquelle *Blastocystis* sp. a conservé ces gènes est certainement liée à un bénéfice conduisant à une augmentation de ses capacités métaboliques, énergétiques, et d'adhésion, lui permettant de s'adapter et de survivre à l'environnement anaérobie du tractus intestinal.

## **C.2 Le génome de *Blastocystis* sp. comporte de manière surprenante des gènes d'origine chloroplastique**

Curieusement, nos analyses phylogénétiques ont révélé l'existence de deux gènes ayant une possible origine cyanobactérienne dans le génome de *Blastocystis* sp., codant pour une phosphoglycérate kinase et une 6-phosphogluconate déshydrogénase (Figure 41). Cette observation n'est néanmoins pas anecdotique, puisque de la même manière, un gène codant une 6-phosphogluconate déshydrogénase a été identifié chez des protistes non-photosynthétiques comme les Heterolobosea (Andersson and Roger, 2002; Maruyama *et al.*,



2008). Chez les straménopiles photosynthétiques, tels que les diatomées et les chrysophytes, la présence de chloroplastes est interprétée comme le résultat d'une endosymbiose secondaire entre une algue rouge et l'ancêtre de ce groupe. La présence de gènes d'origine cyanobactérienne dans le génome de *Blastocystis* sp. suggère donc que les straménopiles hétérotrophes ont perdu secondairement leur chloroplaste, même si nous ne pouvons pas exclure l'acquisition récente de gènes d'origine chloroplastique provenant d'eucaryotes photosynthétiques, comme dans les cas des Heterolobosea.

## **II. Le MLO de *Blastocystis* sp. semble être une mitochondrie anaérobie modifiée**

### **A. Les MLOs présentent un génome typiquement mitochondrial**

Les données d'assemblage du génome nous ont permis de mettre en évidence une molécule d'ADN circulaire d'une taille de 29,27 kpb. L'annotation de cette molécule d'ADN a révélé que celle-ci codait pour des gènes mitochondriaux impliqués dans la machinerie de traduction, et certaines sous-unités du complexe I de la chaîne respiratoire. Néanmoins, à la différence des génomes mitochondriaux d'autres straménopiles comme *Phytophthora* sp., ce génome circulaire que nous qualifions de génome mitochondrial, ne possède aucun gène codant pour les complexes III (Cob), IV (Cox1, Cox2, Cox3) et pour l'ATP synthase (Atp1, Atp6, Atp8, Atp9). Par hybridation *in situ* en MET, nous avons pu montrer que cette molécule d'ADN circulaire était localisée dans la matrice des MLOs. Ce résultat confirme donc que les MLOs de *Blastocystis* sp. possèdent un génome de type mitochondrial.

Deux autres génomes MLOs ont également été séquencés par d'autres équipes, à partir d'un isolat de *Blastocystis* sp. de sous-type 1 (ST1) et d'un autre isolat de sous-type 4 (ST4) (Perez-Brocal and Clark, 2008). Le génome MLO de sous-type 1 présente une taille de 28,382 kpb, alors que celui du sous-type 4 est légèrement plus petit avec une longueur de





27,719 kpb. La comparaison des 3 génomes de MLO, au-delà de leur forte homologie de séquence, indique qu'ils présentent la même capacité codante, et une syntonie très conservée (Figure 42).

La présence d'un génome de type mitochondrial dans les MLOs de *Blastocystis* sp. suggère donc fortement leur caractère mitochondrial.

## **B. Un intermédiaire entre mitochondrie anaérobie et hydrogénosome**

La prédiction du protéome complet des MLOs de *Blastocystis* sp. ST7, réalisée grâce aux données d'annotation du génome, nous a permis d'obtenir des résultats très intéressants sur les métabolismes potentiels pouvant se dérouler dans ces organites. Il apparaît en effet que ces MLOs partagent des caractéristiques enzymatiques communes avec les hydrogénosomes. Ces derniers se distinguent des mitochondries par la présence de deux enzymes clefs, la PFOR, qui réalise la décarboxylation du pyruvate et acétyl-CoA, et l'hydrogénase à fer, responsable de la production d'hydrogène. Nous avons en effet pu identifier ces deux enzymes par prédiction des protéines potentiellement importées aux MLOs (Denoeud *et al.*, 2011). Cette prédiction a également été confirmée par immunomarquage en MET, montrant une localisation de ces deux protéines dans la matrice des MLOs (Wawrzyniak *et al.*, 2008).

Nous avons également procédé (en collaboration avec le Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP), UPR CNRS 9036, Marseille), à des tests d'activités *in vitro* spécifiques des enzymes PFOR et hydrogénase à fer à partir d'échantillons de MLOs purifiés. La mise au point d'un protocole de purification des MLOs a préalablement été réalisée au laboratoire. Les résultats montrent que les MLOs présentent une activité PFOR significative, mais aucune activité de type hydrogénase n'a été détectée. Nous avons obtenu des résultats similaires par la méthode d'échange isotopique hydrogène/deutérium (en collaboration avec le Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et



Microalgues (L3BM), CEA, Cadarache), technique permettant de mettre en évidence *in vivo* la présence d'un site catalytique de type hydrogénase. Ces résultats ne sont pas forcément des résultats négatifs, dans le sens où l'hydrogénase à fer de *Blastocystis* sp. présente une séquence protéique particulière. Celle-ci montre en effet, par rapport à la séquence d'une hydrogénase classique, un domaine C-terminal supplémentaire homologue à une flavodoxine, qui est une protéine pouvant remplir le même rôle qu'une ferrédoxine. Nous pouvons donc imaginer que l'interaction existant entre la PFOR et l'hydrogénase à fer de *Blastocystis* sp. soit différente de celle habituellement rencontrée dans les hydrogénosomes, qui consiste à l'utilisation d'une ferrédoxine comme navette de transport d'électrons entre la PFOR et l'hydrogénase à fer, conduisant à une production d'hydrogène. Ayant à notre disposition au laboratoire des anticorps spécifiques de l'hydrogénase à fer de *Blastocystis* sp., des analyses de co-immunoprécipitation pourraient peut être apporter des réponses sur d'éventuelles partenaires protéiques de cette hydrogénase, encore inconnus aujourd'hui. Nous avons également procédé à des essais préliminaires d'extraction protéiques en conditions natives (technique de BN-PAGE) à partir de MLOs purifiés, afin de mettre en évidence la composition de certains complexes protéiques tels que les complexes I et II. Ce protocole nécessite cependant des étapes de mises au point supplémentaires.

Les MLOs de *Blastocystis* sp. partagent également de nombreuses caractéristiques avec les mitochondries. La plupart des protéines potentiellement importées aux MLOs comportent en effet un signal d'import typiquement mitochondrial. Nous avons également pu identifier dans le protéome de *Blastocystis* sp. 15 protéines impliquées dans les différents complexes du système de translocation des protéines mitochondriales. Nos analyses rapportent aussi la présence de nombreux éléments caractéristiques du métabolisme énergétique de la mitochondrie, comme la présence du complexe PDH, responsable de la décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA. Une Pyruvate:NADP<sup>+</sup> oxydoréductase (PNO), qui est une enzyme résultant de la fusion entre un domaine PFOR et une cytochrome P450 réductase, a également été identifiée. Les MLOs de *Blastocystis* sp. peuvent donc théoriquement utiliser trois voies différentes pour la production d'acétyl-CoA à partir de



pyruvate, supportée par la présence du complexe PDH, de la PFOR et de la PNO, ce qui est effectivement le cas pour les eucaryotes *Euglena* sp. et *Chlamydomonas* sp. Néanmoins chez ces organismes, le complexe PDH est utilisé en conditions aérobies, alors que le système PFOR/PNO fonctionne en conditions anaérobies, permettant à ces organismes d'adapter leur métabolisme à la quantité d'oxygène présente dans leur environnement (Hoffmeister *et al.*, 2004). L'utilisation d'un tel mécanisme d'adaptation par *Blastocystis* sp. semble néanmoins surprenante compte tenu de son caractère anaérobie.

Nos données indiquent également la présence d'une chaîne respiratoire tronquée au sein des MLOs, composée exclusivement des complexes I et II, les gènes codant les sous-unités des complexes III et IV étant absents du génome. Nos résultats expérimentaux suggèrent que cette chaîne respiratoire particulière est responsable du potentiel transmembranaire des MLOs, et que celle-ci fonctionnerait de la même manière que celle rencontrée chez les mitochondries anaérobies, retrouvées chez certains helminthes parasites tels que *Fasciola hepatica* et *Ascaris suum*. Dans ce type de mitochondrie, la chaîne respiratoire n'est en effet composée que des complexes I et II, le complexe II présentant une activité fumarate réductase (FRD), responsable de la production de succinate par la mitochondrie. Le complexe I fournit ainsi les électrons (provenant de l'oxydation du NADH) au complexe II, ces électrons étant nécessaires à la réduction du fumarate en succinate. Le transit des électrons entre les deux complexes est réalisé non pas par une ubiquinone (utilisée en aérobiose), mais par une rholoquinone. Cette chaîne respiratoire particulière, induisant la création d'un gradient protonique électrochimique par l'activité du complexe I, est également connue sous le nom de système NADH-fumarate réductase (Tielens *et al.*, 2002).

Toutefois, aucun gène codant les sous-unités du complexe ATP synthase n'a été identifié dans le génome de *Blastocystis* sp., posant ainsi la question du devenir du gradient électrochimique créé par le complexe I. La production d'ATP par les MLOs de *Blastocystis* sp. ne proviendrait donc pas d'une ATP synthase. Nous avons néanmoins identifié une acétate:succinate-CoA transférase (ASCT) et une succinyl-CoA synthase (SCS), présentant un



signal d'import mitochondrial. Ces deux enzymes, présentes à la fois dans les mitochondries anaérobies et les hydrogénosomes, sont en effet capables de produire de l'énergie sous forme d'ATP, par un phénomène de phosphorylation au niveau du substrat (Tielens *et al.*, 2002). De la même manière, les MLOs de *Blastocystis* sp. pourraient donc produire de l'ATP grâce à l'activité de ces deux protéines.

Nous avons également procédé à des analyses préliminaires de dosage en résonance magnétique nucléaire (RMN) des produits finaux présents dans le surnageant de culture de *Blastocystis* sp. Il semblerait que le produit final majoritaire identifié soit du succinate, ce qui conforte fortement la présence d'un système NADH-fumarate réductase dans les MLOs de *Blastocystis* sp. La preuve ultime de l'existence d'un tel métabolisme consisterait à mettre en évidence la nature de la quinone présente dans les MLOs. Le système NADH-fumarate réductase utilise en effet une rhodoquinone pour le transit des électrons entre le complexe I et le complexe II. Des essais préliminaires de la caractérisation de la quinone présente dans les MLOs ont également été menés par la technique d'HPLC (en collaboration avec le laboratoire de Synthèse et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique (SESIB), UMR CNRS 6504, Clermont-Ferrand), à partir d'une extraction lipidique totale de *Blastocystis* sp. Malheureusement, nous n'avons pas pu déterminer la nature de cette quinone, les échantillons utilisés étant trop peu concentrés. Cette extraction a demandé une quantité de parasites de  $4.10^8$ , ce qui représente plusieurs mois de culture. Néanmoins, il apparaît qu'une quantité encore plus importante soit nécessaire à l'identification de la nature de la quinone en HPLC.

Les MLOs semblent également être impliqués dans d'autres métabolismes essentiels de la mitochondrie, comme la  $\beta$ -oxydation et la synthèse de type II des acides gras, l'assemblage des centres Fe/S, le métabolisme de certains acides aminés, ou encore le système de défense contre le stress oxydant. Ces organites présentent donc des caractéristiques métaboliques typiques des mitochondries aérobies et anaérobies, mais aussi des hydrogénosomes, ce qui conduit à penser que *Blastocystis* sp. possède des





mitochondries anaérobies modifiées, résultant d'une adaptation du parasite à son environnement anaérobie.

### **III. La prédiction du sécrétome de *Blastocystis* sp. révèle la présence de facteurs de virulence**

La persistance de *Blastocystis* sp. dans l'intestin peut être due à sa capacité à se défendre contre le système immunitaire de l'hôte, et à adhérer à l'épithélium intestinal. *Blastocystis* sp. semble avoir développé un système complet d'enzymes antioxydantes, nécessaires à sa protection contre les ions superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), ou les radicaux hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ) produits par son propre métabolisme, mais aussi par les cellules effectrices du système immunitaire de l'hôte (pour plus de détails, voir Tableau S5 ; <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/gb-2011-12-3-r29-S2.PDF>).

La capacité de persistance de *Blastocystis* sp. peut également être facilitée par la libération de molécules pouvant agir à l'interface entre l'hôte et le parasite (Corrales *et al.*, 2010). La prédiction du sécrétome de *Blastocystis* sp. ST7 révèle l'existence de 75 protéines, certaines pouvant potentiellement être impliquées dans le phénomène de pathogénie (protéases, lectines, glycosyltransférases) (pour plus de détails, voir Tableau S4 ; <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/gb-2011-12-3-r29-S2.PDF>). D'après nos données, *Blastocystis* sp. serait capable de sécréter des immunophilines, connues chez certaines bactéries comme jouant un rôle dans des phénomènes d'adhésion, de modulation du système immunitaire de l'hôte, et d'apoptose (Henderson, 2008).

La capacité de certaines protéines parasitaires à se fixer sur des récepteurs glycosylés des cellules de l'hôte peut également moduler la réponse immunitaire de celui-ci, en conduisant par exemple à une inhibition des cytokines Th1 et Th2 nécessaires au processus d'inflammation (Toscano *et al.*, 2006). L'interaction de ces protéines avec leur(s) cible(s) est liée à la reconnaissance de motifs sucrés spécifiques, qui peuvent être modifiés par l'action de glycosyltransférases. Nous avons identifié dans le sécrétome *in silico* de *Blastocystis* sp.



une protéine capable de se lier à des glycanes, et 8 glycosyltransférases, ces dernières étant susceptibles de modifier les motifs glycaniques des récepteurs présents à la surface des cellules intestinales. *Blastocystis* sp. serait également capable de sécréter des hydrolases (fucosidase, hexoaminidase, polygalacturonase), lui permettant d'attaquer l'épithélium intestinal en dégradant de nombreuses glycoprotéines.

Les protéases sont certainement les protéines les plus connues en matière de facteurs de virulence, et sont impliquées dans divers processus, comme l'invasion des cellules, le dékystement, la cytoadhérence, le métabolisme. Ainsi, une corrélation a été mise en évidence entre une forte activité des protéases et la virulence d'*E. histolytica* (McKerrow *et al.*, 1993). De plus, certaines cystéines protéases sont connues pour dégrader les matrices extracellulaires ou cliver les immunoglobulines A et G (Klemba and Goldberg, 2002). De manière intéressante, il a été montré expérimentalement que *Blastocystis* sp. comporte des enzymes protéolytiques capables de dégrader des immunoglobulines A humaines (Puthia *et al.*, 2005). Les principales classes de protéases sont retrouvées dans le protéome de *Blastocystis* sp. Parmi les 66 protéases identifiées, 18 sont potentiellement sécrétées. La famille des cystéines protéases est largement représentée. Parmi ces cystéine-protéases, nous avons identifié 5 légumaines et 8 cathépsines. Les cystéines protéases sont généralement sécrétées sous forme inactive, et doivent être maturées par le clivage d'un pro-ségment, réalisé par la protéase elle-même ou par d'autres protéases comme les légumaines. Les légumaines peuvent également participer à d'autres phénomènes cellulaires, et sont notamment connues pour être impliquées dans le phénomène d'apoptose chez les plantes, en ayant un rôle pro-apoptotique. Nous avons récemment décrit la présence d'une légumaine chez *Blastocystis* sp. sous-type 7 (ST7), mais celle-ci est curieusement localisée à la surface du parasite, et semble plutôt avoir un rôle d'inhibition de l'apoptose (Wu *et al.*, 2010) (pour plus de détails, voir Chapitres IV Annexe 1).

Il semble donc, aux vues de ces résultats de prédiction, que *Blastocystis* sp. comporte un potentiel de virulence, pouvant agir sur le système immunitaire ou l'attaque de



l'épithélium intestinal de l'hôte. Des expérimentations sont actuellement à l'étude, afin de confirmer certaines données *in silico*, notamment sur le rôle de certaines cystéine-protéases.

Certaines informations apportées par la prédiction de gènes codant potentiellement pour ces facteurs de virulence pourraient également être vérifiées par une approche de génétique fonctionnelle, technique qui n'existe actuellement pas pour *Blastocystis* sp. Nous avons en ce sens procédé à des essais de transfection transitoire du parasite, en utilisant la technique d'électroporation, largement utilisée pour la transfection de parasites comme *Trichomonas vaginalis* ou *Entamoeba histolytica* (Delgadillo *et al.*, 1997; Nickel and Tannich, 1994; Purdy *et al.*, 1994). Malheureusement, les protocoles utilisés pour la transfection de ces parasites par électroporation ne sont pas adaptés à *Blastocystis* sp., probablement en raison de la fragilité de la forme vacuolaire, impliquant l'élaboration et la mise au point de nouveaux protocoles de transfection.

La mise en place d'une approche de génétique fonctionnelle chez *Blastocystis* sp. est en effet primordiale pour la compréhension de la biologie de ce parasite, et de son éventuel pouvoir pathogène.



# **Chapitre IV**

## **Annexes**





I. **Annexe 1 – Etude d'un facteur de virulence potentiel (légumaine) chez *Blastocystis* sp.**

**Blastocystis legumain is localized on the cell surface, and specific inhibition of its activity implicates a pro-survival role for the enzyme**

Binhui Wu, Jing Yin, Catherine Texier, Michaël Roussel,

et Kevin Shyong-Wei Tan

*The Journal of Biological Chemistry* (2010), Vol. **285**(3), p. 1790-8



# **Blastocystis Legumain Is Localized on the Cell Surface, and Specific Inhibition of Its Activity Implicates a Pro-survival Role for the Enzyme\***<sup>[S]</sup>

Received for publication, July 26, 2009, and in revised form, November 8, 2009. Published, JBC Papers in Press, November 13, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.049064

Binhui Wu<sup>†1</sup>, Jing Yin<sup>†1</sup>, Catherine Texier<sup>S¶</sup>, Michaël Roussel<sup>S¶</sup>, and Kevin Shyong-Wei Tan<sup>‡||2</sup>

From the <sup>†</sup>Department of Microbiology, Yong Loo Lin School of Medicine, and <sup>||</sup>Infectious Disease Program, Life Sciences Institute, National University of Singapore, Singapore 117597, <sup>S</sup>Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France, and the <sup>¶</sup>Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, UMR 6023, CNRS, F-63173 Aubière, France

Programmed cell death (PCD) is crucial for cellular growth and development in multicellular organisms. Although distinct PCD features have been described for unicellular eukaryotes, homology searches have failed to reveal clear PCD-related orthologues among these organisms. Our previous studies revealed that a surface-reactive monoclonal antibody (mAb) 1D5 could induce multiple PCD pathways in the protozoan *Blastocystis*. In this study, we identified, by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, the target of mAb 1D5 as a surface-localized legumain, an asparagine endopeptidase that is usually found in lysosomal/acidic compartments of other organisms. Recombinant *Blastocystis* legumain displayed biphasic pH optima in substrate assays, with peaks at pH 4 and 7.5. Activity of *Blastocystis* legumain was greatly inhibited by the legumain-specific inhibitor carbobenzyloxy-Ala-Ala-AA<sub>sn</sub>-epoxycarboxylate ethyl ester (APE-RR) (where AA<sub>sn</sub> is aza-asparagine) and moderately inhibited by mAb 1D5, cystatin, and caspase-1 inhibitor. Interestingly, inhibition of legumain activity induced PCD in *Blastocystis*, observed by increased externalization of phosphatidylserine residues and *in situ* DNA fragmentation. In contrast to plants, in which legumains have been shown to play a pro-death role, legumain appears to display a pro-survival role in *Blastocystis*.

Programmed cell death in the unicellular protozoa is now accepted as a well established phenomenon. Several stereotypic apoptotic morphological markers similar to those observed in apoptotic metazoan cells have been described in human parasitic protozoa such as *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Plasmodium falciparum*, and *Blastocystis* (1, 2). Despite a wealth of information on the

organelles and cytochemical features involved in protozoan PCD, there is a scarcity of information on PCD<sup>3</sup>-related molecular mediators. Our earlier studies showed that *Blastocystis* undergoes programmed cell death when exposed to the surface-reactive monoclonal antibody mAb 1D5 with typical features of apoptotic cells (3, 4). mAb 1D5 was shown to target a 30-kDa protein found on the plasma membrane of *Blastocystis* (5–7). This protein is functionally important, but not all cells within a clonal population would be susceptible to the cytotoxic effects of mAb 1D5 (6). These results suggest that this protein may have multiple localizations and is potentially important for cell survival. In this study, an asparaginyl cysteine protease legumain was identified as the mAb 1D5 targeting protein. Legumain is a recently described lysosomal protease, well conserved and present in plants, mammals, helminth worms, and the protozoan *Trichomonas vaginalis* (8–12). The active site of legumain contains the catalytic dyad His-Gly-spacer-Ala-Cys, a characteristic shared with caspases, aspartyl cysteine proteases important as molecular mediators of apoptosis cascades (13). Legumains have specificity for the hydrolysis of bonds on the carboxyl side of asparagines (14) but have also been reported to cleave after aspartate residues, evidenced by their ability to cleave caspase-1 substrates (15, 16). In plants, legumain, also termed vacuolar processing enzyme (VPE), is localized within the plant cell vacuole and is essential for hypersensitive-response cell death, a mechanism of resistance to pathogen infection (15). In mammals, it is predominantly localized in the lysosomes and involved in processing bacterial and endogenous peptides for major histocompatibility complex class II presentation. Legumain is overexpressed in many types of tumors and is associated with enhanced tissue invasion and metastasis. In these cases, the enzyme can also be found on the cell surface, co-localized with integrin  $\beta$ 1 (17).

In this study, we report for the first time the detailed characterization of *Blastocystis* legumain protein as a target of a pre-

\* This work was supported by Biomedical Research Council Grant 05/1/21/19/378, the National Medical Research Council (06May107), and the Infectious Disease Program.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1 and S2.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) ACO24555 and GU124590.

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed: 5 Science Drive 2, Singapore 117597. Tel.: 65-6516-6780; Fax: 65-6776-6872; E-mail: mictank@nus.edu.sg.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: PCD, programmed cell death; mAb, monoclonal IgM antibody; PI, propidium iodide; PS, phosphatidylserine; TUNEL, TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling; VPE, vacuolar processing enzyme; GST, glutathione S-transferase; Z, benzyloxycarbonyl; PBS, phosphate-buffered saline; IEF, isoelectric focusing; MES, 4-morpholineethanesulfonic acid; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; r-legumain, recombinant legumain; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight; NHMec, 7-(4-methyl)coumarylamide.

viously described cytotoxic mAb. *Blastocystis* legumain was expressed in *Escherichia coli*, and the purified recombinant protein was used to define enzymatic properties. Cellular localization of this protein was investigated by anti-legumain antibody and mAb 1D5. The involvement of legumain in programmed cell death was investigated by protease inhibitor assays, annexin V, and TUNEL apoptosis assays to determine the extent of phosphatidylserine externalization and DNA fragmentation, respectively. The data strongly suggest that *Blastocystis* legumain has a key role in the regulation of *Blastocystis* cell death.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Parasite Cell Culture**—*Blastocystis* isolate B (subtype 7) was isolated from the stool of a local patient. Parasite cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium containing 10% inactivated horse serum and incubated anaerobically at 37 °C in an Anaerojar (Oxoid). 4-Day-old cells at log phase were used for all experiments. Cell number was counted with a hemocytometer, and their viability was examined morphologically by a light microscope.

**Two-dimensional Electrophoresis**—Parasite lysate was prepared by three freeze-thaw cycles in liquid nitrogen and a 37 °C water bath. Cell debris was removed by centrifugation at  $14,500 \times g$  for 10 min at 4 °C. Total proteins from clarified cell lysate were precipitated by 10% trichloroacetic acid. The dried pellet was dissolved in 20 mM Tris-Cl buffer, pH 7.0, and protein concentration was determined by the Bradford assay (Sigma). The first dimension IEFs were performed on 18-cm IEF gel strips (pH 4–7, Bio-Rad) following the manufacturer's instructions. Briefly, the dried strips were rehydrated at room temperature overnight with 375  $\mu$ l of rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 50 mM dithiothreitol, 3% IPG buffer, 0.02% bromophenol blue) and 50  $\mu$ g of protein. IEF strips were loaded onto a Protean IEF cell (Bio-Rad) by using the following parameters: 500 V for 500 V-h; 1000 V for 500 V-h; 8000 V gradient for 4500 V-h; and 8000 V for 64,000 V-h. Subsequently, strips were soaked in 10 ml of equilibration solution (7 M urea, 0.05 M Tris-Cl, pH 6.8, 30% glycerol, 2% SDS) supplied with 0.1% dithiothreitol for 15 min, removed, and further soaked in equilibration solution containing 0.25% iodoacetamide and 0.02% bromophenol blue for 15 min. Strips were laid on top of a 10% SDS-polyacrylamide gel (Protean II XI, Bio-Rad), and electrophoresis was performed at 5 °C. Current was kept constant at 7 mA per gel for 1 h and then increased to 25 mA per gel for another 6 h. Protein was visualized by Coomassie Brilliant Blue staining.

**Protein Identification**—A gel slice encompassing the protein of interest was cut out, soaked in 200  $\mu$ l of 50% (v/v) acetonitrile with 50 mM ammonium bicarbonate, and incubated at 37 °C for 30 min to destain. The gel slice was dried for 5 min using a SpeedVac concentrator and soaked in 20  $\mu$ l of trypsin (3.33 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>, diluted in 50 mM ammonium bicarbonate) at 30 °C overnight or 37 °C for 4 h. Peptides were extracted using 50% (v/v) acetonitrile with 0.5% (v/v) trifluoroacetic acid (200  $\mu$ l) followed by sonication (10 min) at 37 °C. The solution was dried using a SpeedVac concentrator and redissolved in 50% (v/v) acetonitrile with 0.5% (v/v) trifluoroacetic acid (1.5  $\mu$ l). Pep-

tides were desalted using a ZipTip (Millipore) and mixed with an equal volume of matrix solution ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (5 mg) dissolved in 50% (v/v) acetonitrile with 0.5% (v/v) trifluoroacetic acid (1 ml)) and spotted (1  $\mu$ l) onto a MALDI plate (384 Opti-TOF®, Applied Biosystems). After air drying, spots were identified by a combination of mass spectrometry followed by tandem mass spectrometry (10 largest peaks) using an ABI 4800 MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems). Peptides derived from trypsin were used as an internal standard. The tandem mass spectrometry results were analyzed by searching the SwissProt Protein Data Base using Mascot version 1.9.

**Western Blotting**—mAb 1D5, a murine IgM monoclonal antibody produced in this laboratory (7), was purified using an affinity column (Affiland). Anti-human legumain was purchased commercially (Cell Signaling). Parasite cells were lysed in buffer (25 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM NaF, 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Roche Applied Science complete protease inhibitor), and the soluble fraction was obtained by centrifugation ( $14,500 \times g$ , 10 min) at 4 °C. The total protein concentration was determined by the Bradford assay. 50  $\mu$ g of total protein or 5  $\mu$ g of purified protein was electrophoresed on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (GE Healthcare) by semi-dry blotting (Bio-Rad), blocked with 2% bovine serum albumin in TBS-T (triethanolamine-buffered saline with 0.1% Tween), incubated with primary antibody, washed, incubated with secondary antibody, visualized by chemiluminescence (ECL Plus, GE Healthcare), and exposed to an x-ray film (Eastman Kodak Co.).

**Legumain Cloning and Expression**—PCR primers were synthesized according to the peptide sequences from mass spectrometry as follows: P1 (5'-TTTGTNTCNATNGCNCTNCTNCGN-3' and complementary sequence); P4 (5'-GATGACTTTCANGCNACNCTNAAG-3' and complementary sequence); P6 (5'-TTTAACACTACGANCANCAAGTCNAGC-3' and complementary sequence); P7 (5'-TACCTNGAAGAGATGTCTNCTNCGN-3' and complementary sequence), where *N* represents A, T, G, or C. Forward and reverse primers were picked randomly. In total, 12 primer pair combinations were used for PCR. PCRs were performed with the Faststart high fidelity PCR system (Roche Applied Science) according to the manufacturer's protocol with *Blastocystis* cDNA library as template. PCR products were electrophoresed in a 1% agarose gel. Appropriate PCR products were excised, purified from the gel, and cloned into pCR2.1 (Invitrogen) by TOPO cloning for sequencing. Five positive plasmids were sequenced with M13<sup>+</sup> and M13<sup>-</sup> primers, and consensus sequence was obtained. This product was amplified again by PCR using primers (forward, 5'-TTAGGATCCATGTTTGTGAGTATCGCCTTACT-3', and reverse, 5'-ATCTCGAGACGAAGGCACATCTCCTC-3'). These primers contained BamHI and XhoI restriction sites to allow directional cloning into *E. coli* expression vector pGEX-6p-1 (GE Healthcare). pGEX-6p-1 containing the *Blastocystis* legumain gene was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and amplified in 500 ml of LB containing 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> ampicillin at 37 °C and 200 rpm. After A<sub>600</sub> reached 0.6–0.8, isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-

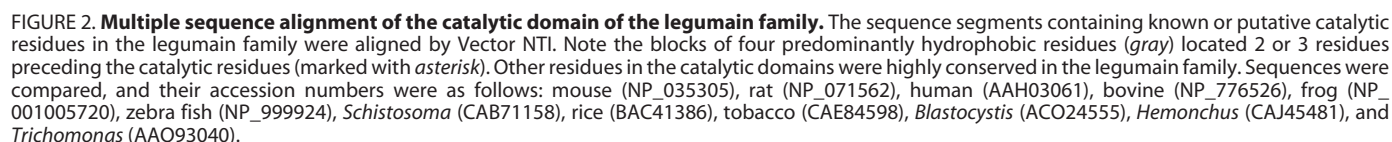
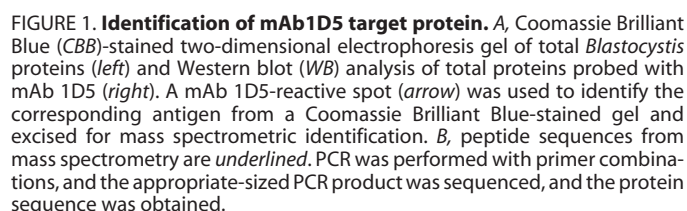


## Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on July 31, 2017

**Purification of Recombinant Legumain**—The lysate of transformed BL21(DE3) cells was clarified by centrifuging at 25,000  $\times g$  for 20 min at 4 °C, incubated with 2 ml of glutathi-

**Enzymatic Characterization of Legumain**—Purified recombinant legumain (10  $\mu\text{g}$ ) was placed in a 96-well microplate, and the reaction was started by adding the legumain-specific substrate Z-Ala-Ala-Asn-NHMec (10  $\mu\text{M}$  final concentration) in assay buffer (PBS, containing 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, and 0.1% CHAPS) and incubated at 30 °C. Fluorescence was determined at 5 and 35 min at excitation 353 nm, emission 442 nm by a TECAN fluorescence plate reader. Rate of change between these two readings was the measurement of protease activity (relative fluorescence units/min). For pH dependence activity assays, PBS was replaced with 50 mM buffer adjusted to different pH values (citric acid/sodium citric, pH 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, and 6; MES, pH 6.5 and 6.8; Tris-Cl, pH 7, 7.5, 8, and 8.8). For inhibition assays, inhibitors used were as follows: mAb 1D5 (1.2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ); nonspecific IgM control (2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ); legumain-specific inhibitor carbobenzyloxy-Ala-Ala-AAsn-epoxycarboxylate, ethyl ester (APE-RR, 1 mM) (where AAsn is aza-asparagine); Z-Ala-Ala-Asn-NHMec (10  $\mu\text{M}$ ); cystatin (200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ); caspase-1 inhibitor Ac-YVAD-chloromethyl ketone (4  $\mu\text{M}$ ); and cathepsin B inhibitor Z-FA-fluoromethyl ketone (400  $\mu\text{M}$ ).

**Cellular Localization of *Blastocystis Legumain***—Cells ( $1 \times 10^7$ ) were washed with cold PBS and incubated in Iscove's modified Dulbecco's medium containing 5  $\mu\text{g}$  of fluorescein diacetate at 37 °C for 10 min, washed, and fixed with 3.7% (v/v) formaldehyde on ice for 30 min. To permeabilize cells, cells were incubated with 0.1% Triton X-100 for 5 min. Cells were incubated with primary antibody (mAb 1D5 or anti-legumain, 1.2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  in PBS containing 3% bovine serum albumin) for 2 h at room temperature, washed, and incubated with AlexaFluor 594-conjugated secondary antibody (anti-mouse IgM or anti-goat IgG, 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  in PBS containing 3% bovine serum albumin) for 1 h at room temperature. The cells were washed and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole and viewed under a confocal microscopy (Olympus FV500).



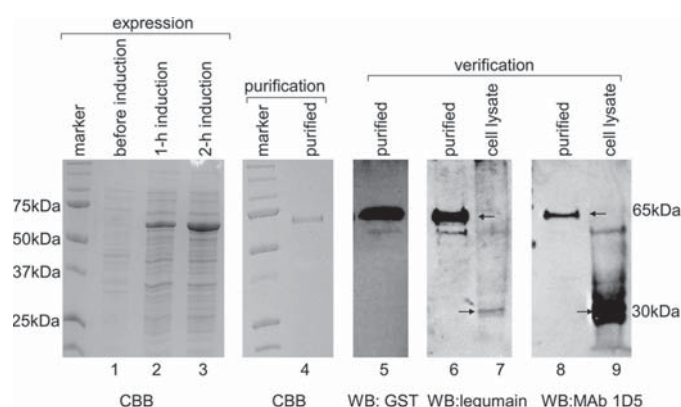
**Annexin V Apoptosis Assay**—Loss of membrane permeability and exposure of phosphatidylserine (PS) were detected using an annexin V-fluorescein isothiocyanate apoptosis detection kit (BioVision) following the manufacturer's instructions. In brief, 4-h treated (with antibody or inhibitors mentioned previously) or untreated cells ( $1 \times 10^7$ ) were washed with cold PBS and incubated with  $0.21 \mu\text{g ml}^{-1}$  annexin V-fluorescein isothiocyanate and  $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  propidium iodide at room temperature for 10 min. The cells were washed, resuspended in 500  $\mu\text{l}$  of PBS, and analyzed by a flow cytometer (DAKO CyAn ADP) to read green and red fluorescence.

**TUNEL Assay for DNA Fragmentation**—TUNEL was performed using APO- bromodeoxyuridine kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. In brief, 24-h treated (with anti-

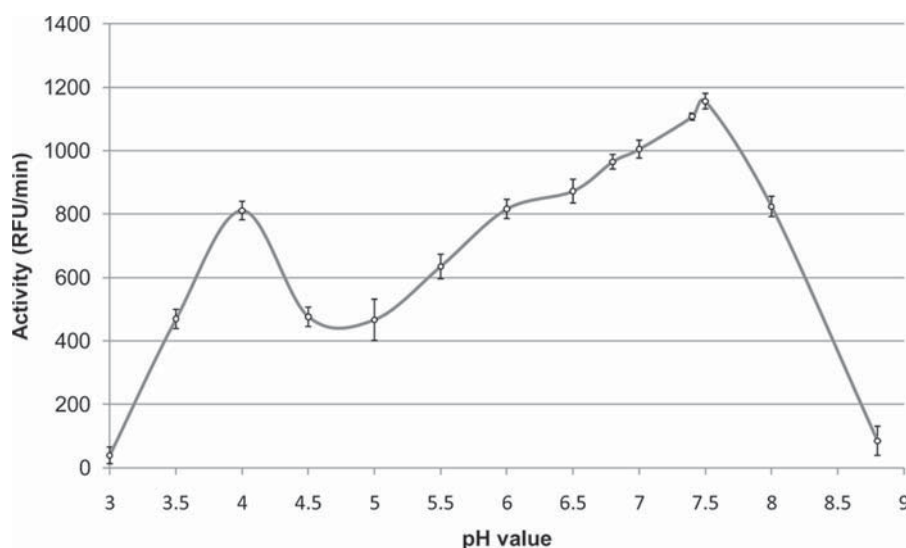
body or the inhibitors mentioned previously) or untreated cells ( $1 \times 10^7$ ) were washed with cold PBS and fixed in 1 ml of 3.7% (v/v) formaldehyde on ice for 30 min, washed, and resuspended in 1 ml of 70% cold ethanol at  $-20^\circ\text{C}$  for 30 min to permeabilize cells. The cells were washed and incubated with 50  $\mu\text{l}$  of labeling solution at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h. After rinsing, cells were stained with AlexaFluor 488-conjugated anti-bromodeoxyuridine antibody at room temperature for 30 min. The cells were washed, resuspended in 500  $\mu\text{l}$  of PBS, and analyzed by a flow cytometer (DAKO CyAn ADP) to read green fluorescence.

## RESULTS

**Identification of mAb 1D5 Target Protein**—Total *Blastocystis* proteins were separated by two-dimensional electrophoresis and probed with mAb 1D5. A distinct spot of 30 kDa, consistent with our previous studies (6, 7), was observed (Fig. 1A). The corresponding protein spot in the Coomassie Brilliant Blue-stained gel was analyzed by mass spectrometry. In total, seven tryptic peptides were sequenced (Fig. 1B, underlined). Among them, peptides 2, 3, and 5 matched the catalytic domain of legumain sequences from human, rat, mouse, and bovine origins. This suggests that the protein analyzed might be a member of the legumain family. Peptides 1, 4, 6, and 7 did not match any conserved regions of legumain and might be unique to *Blastocystis* legumain and located at the N or C terminus. Degenerate PCR primers were designed according to the sequences of these seven peptides resulting in 12 pairs of PCR primer combinations. The longest PCR product of  $\sim 1$  kb was cloned and sequenced. It included 990 bp and encoded a 33-amino acid protein (GenBank<sup>TM</sup> accession number ACO24555) with a theoretical molecular mass of 37.5 kDa and pI value of 4.9, as calculated by the Vector NTI program. The full-length gene was obtained by 5'-rapid amplification of cDNA ends and 3'-rapid amplification of cDNA ends (1194 bp, [supplemental Fig. S1](#); GenBank<sup>TM</sup> accession number GU124590). This sequence included a highly conserved catalytic domain that had 40–60% similarity to that of



**FIGURE 3. Expression, purification, and verification of *Blastocystis* legumain.** The *Blastocystis* legumain gene was inserted into pGEX-6p-1 and expressed in *E. coli* BL21(DE3) with induction of 0.5 mM isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside at  $16^\circ\text{C}$  (lanes 1–3). The expressed recombinant legumain was then purified by glutathione affinity column, and purity was assessed by SDS-PAGE (lane 4). Purified legumain was subjected to Western blotting (WB) and probed with anti-GST to confirm the purification (lane 5). Western blots of purified legumain and *Blastocystis* cell lysate were performed and probed with anti-human legumain and mAb 1D5, showing distinct bands at 65 kDa (legumain with GST tag) and 30 kDa (legumain). CBB, Coomassie Brilliant Blue.



**FIGURE 4. pH dependence of *Blastocystis* legumain.** Purified r-legumain and fluorogenic substrate Z-Ala-Ala-Asn-NHMe were incubated at  $30^\circ\text{C}$  with pH buffers ranging from pH 3.0 to 8.8. Activity (relative fluorescence units/min (RFU/min)) was plotted against pH values. Values are means  $\pm$  S.D. (error bars) from three independent experiments.

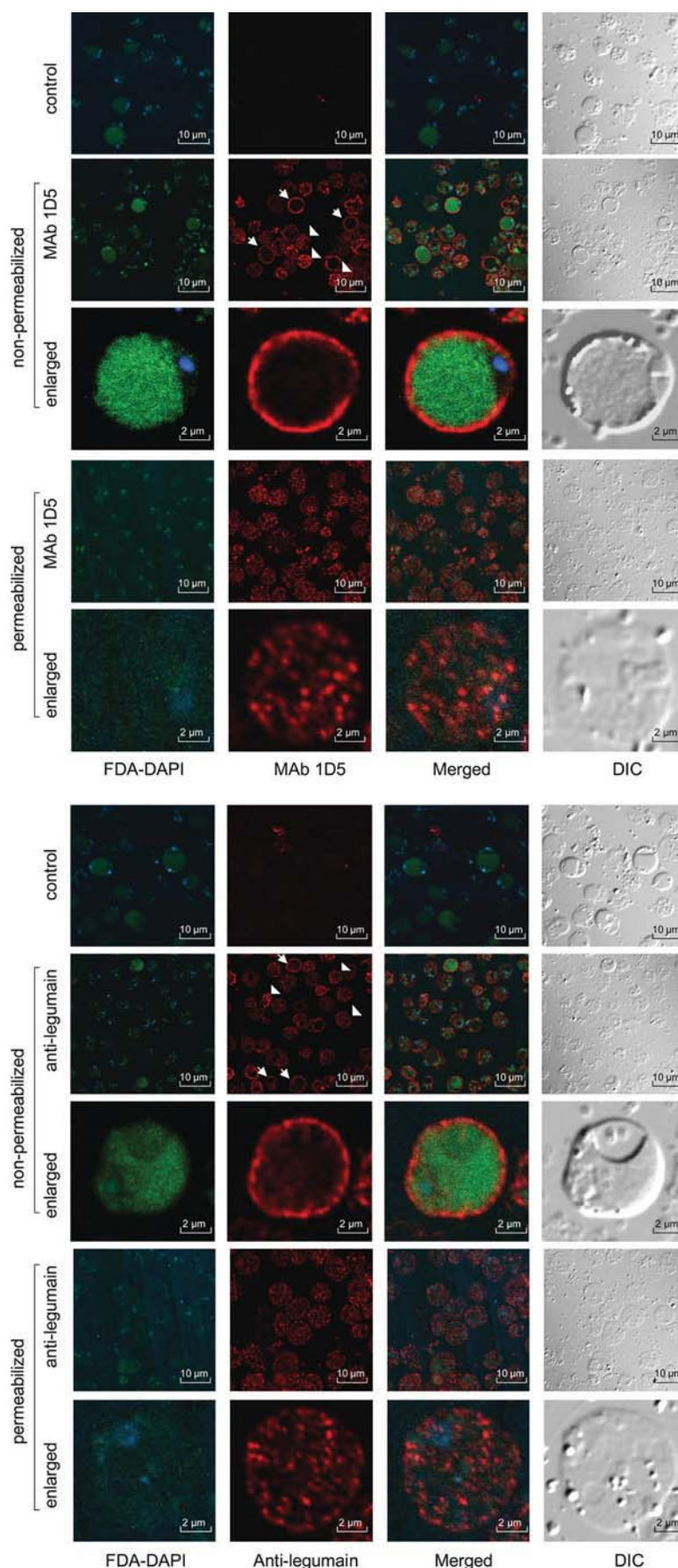
legumains from other origins and by ClustalW was shown to possess unique N- and C-terminal regions (data not shown). As with other legumains, the *Blastocystis* orthologue presumably codes for a precursor that is auto-cleaved at the C-terminal asparagine residue (18), possibly at Asn-285 to result in the mature form (30-kDa protein). *Blastocystis* legumain contains a catalytic dyad with the motif His-Gly-spacer-Ala-Cys, which is also found in other legumains (Fig. 2) and in caspases (13). Interestingly, the first 16 amino acids (KFV-SIALLRVLAALAAA) include a putative secretory signal peptide, which was also observed in the legumain sequence of the Chinese liver fluke *Clonorchis sinensis* (19) and not from legumains of other origins.



## Protozoan Surface Legumain Involved in PCD

**Expression, Purification, and Verification of Legumain**—*Blastocystis* legumain (truncated form missing 66 amino acids at the 3' end and when compared with the full-length sequence) was expressed in *E. coli* (Fig. 3). The appearance and accumulation of the overexpressed protein band in *E. coli* total extracts after 1-h (Fig. 3, lane 2) and 2-h (lane 3) isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside induction could be detected in comparison with total extracts before induction (lane 1). About 70% overexpressed protein was insoluble, and soluble recombinant protein was purified using the N-terminal GST tag (Fig. 3, lane 4). The GST-tagged legumain was about 65 kDa and its purity was about 95%. The purified recombinant protein was confirmed by anti-GST antibody on the Western blot (Fig. 3, lane 5). To confirm that the purified recombinant protein was legumain and that this was a *bona fide* target of mAb 1D5, Western blots of the recombinant protein were probed with anti-human legumain (IgG) or mAb 1D5 with *Blastocystis* cell lysate as a reference and control. Results showed that there were bands at the expected positions (Fig. 3, recombinant legumain, lanes 6 and 8, 65 kDa, and cell lysate, lanes 7 and 9, 30 kDa). The variations in band intensities may be due to mAb 1D5 and anti-human legumain possessing different affinities for precursor and mature forms of legumain. Furthermore, another truncated legumain gene missing 15 amino acids at the 5' end, which removes a putative secretory signal peptide, was expressed in *E. coli* using the same induction method. The His<sub>6</sub>-tagged protein was then purified, and activity and inhibitor assays were performed to study the effect of the signal peptide on enzyme activity. The results (supplemental Fig. S2) showed that legumain with or without signal peptide displayed similar protease activities.

**pH Dependence of Legumain Activity**—Purified recombinant legumain was incubated at 30 °C with pH buffers in the range of pH 3.0 –





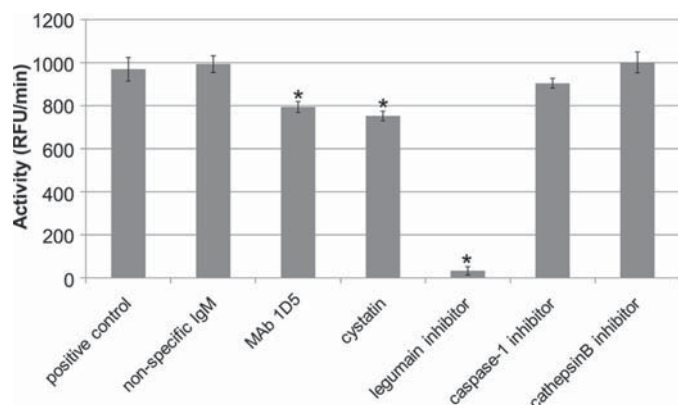


FIGURE 6. **Inhibition of *Blastocystis* legumain protease activity by antibody and inhibitors.** Purified r-legumain and fluorogenic substrate Z-Ala-Ala-Asn-NHMeC were incubated at 30 °C in the presence or absence of antibody or protease inhibitor in PBS. MOCK control was performed with the same volume of antibody (PBS) or inhibitor (DMSO) diluent. Values are means  $\pm$  S.D. (error bar) from three independent experiments. \*,  $p < 0.01$  versus MOCK control.

8.8, and activity against legumain-specific substrate Z-Ala-Ala-Asn-NHMeC was measured. Interestingly, two distinct peaks, one at pH 4.0 and the other one at pH 7.5, could be observed (Fig. 4). The reason for this unusual biphasic activity profile is not known but may be related to the localization of *Blastocystis* legumain in intracellular compartments and on the parasite surface (see below).

**Cellular Localization of *Blastocystis* Legumain**—To investigate the localization of legumain in *Blastocystis*, mAb 1D5 and anti-human legumain were used as primary antibodies to stain nonpermeabilized and permeabilized *Blastocystis* cells. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (blue, nuclear staining) and fluorescein diacetate (green, staining cytoplasm and central vacuole) were included to visualize cellular structures. *Blastocystis* cells have a large central vacuole that occupies ~90% of the cell volume and forces the cytoplasm and organelles into a very thin peripheral rim (20). Both antibodies revealed surface labeling in nonpermeabilized samples, whereas intracellular localization within vesicular-like structures was observed on permeabilized samples (Fig. 5). This result suggests that *Blastocystis* legumain localizes on the cell surface as well as in the cytoplasm and central vacuole.

**Regulation of Legumain Protease Activity**—Recombinant legumain protease activity was performed in PBS buffer with fluorogenic substrate Z-Ala-Ala-Asn-NHMeC in the presence of mAb 1D5 or inhibitor. From the results (Fig. 6), the legumain-specific inhibitor carbobenzyloxy-Ala-Ala-AAAsn-epoxycarboxylate ethyl ester (APE-RR) showed over 90% inhibition when compared with MOCK control; monoclonal antibody mAb 1D5 showed about 20% inhibition; cystatin showed about 25% inhibition, and caspase-1 inhibitor Ac-YVAD-CMK had only a 10% inhibitory effect. There were no inhibitory effects for nonspecific IgM and cathepsin B inhibitor Z-FA-

fluoromethyl ketone even when the final concentration of the inhibitor was increased by 5-fold (data not shown).

**Annexin V Apoptosis Assay**—Previous studies showed that mAb 1D5 induces PCD features in *Blastocystis* (2, 21). We asked if the induction of PCD was triggered by inhibition of surface legumain activity. *Blastocystis* cells were incubated for 4 h with antibody mAb 1D5 or protease inhibitors described above. To ensure reaction specificity, competitive inhibition assays were included. This involved the preincubation of mAb 1D5 or legumain inhibitor APE-RR with purified recombinant legumain protein (r-legumain) at a molar ratio of 1:2 for 30 min before adding to cells. Annexin V-fluorescein isothiocyanate staining was used to detect flipped PS as an early signal of cell apoptosis. From the results (Fig. 7), 18.29% of the population was annexin V-positive in mAb 1D5-treated cells; 49.53% of the population was annexin V-positive in cystatin-treated cells; and 47.04% of the population was annexin V-positive in legumain inhibitor-treated cells. The extensive annexin V-positive population seen in mAb 1D5 and legumain inhibitor-treated cells was abrogated when mAb 1D5 or legumain inhibitor was preincubated with purified r-legumain. There was no significant increase of annexin V-positive cells for cells treated with caspase-1 and cathepsin B inhibitor. The percentage of annexin V-positive cells in mAb 1D5-treated cells might be less than the actual value, which can probably be attributed to the blockage of annexin V access to PS by the surrounding antibodies.

**TUNEL Assay**—To confirm the correlation between legumain protease activity with cell death, the TUNEL assay was employed to quantify *in situ* DNA fragmentation, a late stage PCD event. *Blastocystis* cells were incubated for 24 h with antibody mAb 1D5, protease inhibitors, preneutralized mAb 1D5, or legumain inhibitor. As shown in Fig. 8, 90.11% of the population was TUNEL-positive in cystatin-treated cells; 80.25% of the population was TUNEL-positive in legumain inhibitor-treated cells; and 47.17% of the population was TUNEL-positive when cells were treated with mAb 1D5. Similar to the trend observed in the annexin V apoptosis assay, there was no significant increase in TUNEL-positive cells when these were treated with caspase-1 inhibitor (2.5%) or cathepsin B inhibitor (0.97%). As also observed for the annexin V assays, the r-legumain-preincubated mAb 1D5 and the legumain inhibitor showed no significant increase in TUNEL-positive cells.

## DISCUSSION

Our previous studies showed that the cytotoxic surface-reactive mAb 1D5 induced a number of typical PCD features in *Blastocystis* (3, 21, 22), including cell shrinkage, caspase-like activity, PS externalization, mitochondrial outer membrane permeabilization, and DNA fragmentation. This study reveals that the target of mAb 1D5 is a surface legumain. Comparison of *Blastocystis* full-length protein sequence with other legumain sequences showed that *Blastocystis* legumain was 30.1%

FIGURE 5. **Localization of mAb 1D5 and anti-legumain.** Nonpermeabilized or permeabilized cells were incubated with primary antibody (mAb 1D5 or anti-legumain) followed by incubated with AlexaFluor 594-conjugated secondary antibody (red). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue), and cytoplasm and central vacuole were stained with fluorescein diacetate (FDA) (green). A confocal microscope with differential interference contrast (DIC) optics was used to observe cell morphology. Arrows indicate healthy cells revealing surface labeling, and triangles indicate cells with compromised membranes resulting in intracellular staining. Control conditions include absence of primary antibody or using nonspecific antibody as the primary antibody.

## Protozoan Surface Legumain Involved in PCD

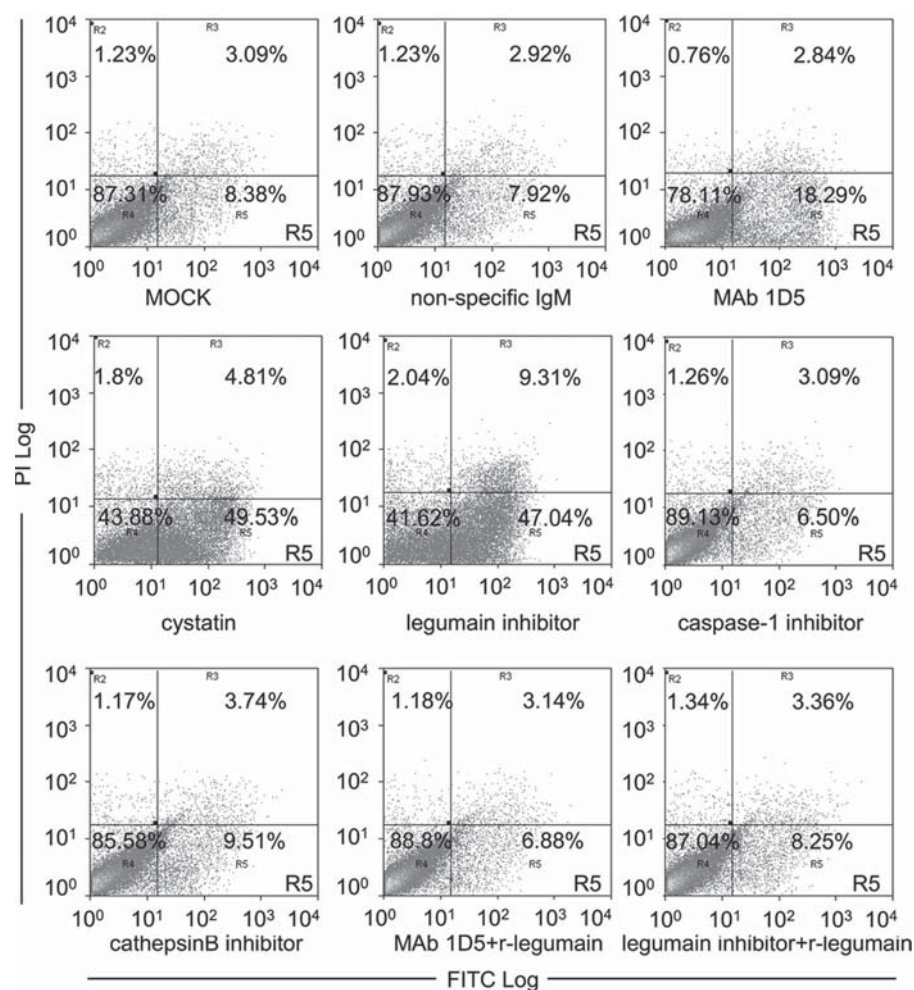


FIGURE 7. **Annexin V apoptosis assay for inhibitor-pretreated cells.** Cells were pretreated under different conditions (cultured with antibody, inhibitors, or neutralized antibody and inhibitor) for 4 h. Cells were stained with annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) to detect PS on the cell surface, and propidium iodide (PI) was used to stain cells with loss of plasma membrane integrity. 20,000 cells were analyzed by a flow cytometer. The R5 quadrant represents the percentage of apoptotic cells (annexin V-fluorescein isothiocyanate positive/propidium iodide-negative cells) in the total cell population. MOCK control was performed with the same volume of antibody (PBS) or inhibitor (DMSO) diluent. Nonspecific IgM was used as negative antibody control.

identical to human, 28.4% identical to blood fluke, and 22.8% identical to *T. vaginalis* legumains. Key conserved features include the catalytic His-Cys dyad, four predominantly hydrophobic amino acids closely preceding each of the catalytic residues, putative N-terminal prodomain and C-terminal extension, activity against legumain substrates, and inhibition by legumain-specific inhibitors. From the multiple sequence alignment, *Blastocystis* legumain possesses unique N- and C-terminal regions, suggesting downstream substrates, localization, and other properties distinct from reported legumains. Regarding pH dependence of stability and activity, mammalian and plant legumains have been found to be unstable at neutral pH (23) and to exhibit optimal activity at low pH, with the pH optimum of human legumain at pH 4.0 (14), pig legumain at pH 5.8 (23), and kidney bean legumain at pH 5.4 (23). Legumains from parasite origins, in contrast, have pH optimum near neutral pH, e.g. *T. vaginalis* legumain at pH 7.0 (24) and the helminths *Hemonchus contortus* and *Schistosoma mansoni* legumains at pH 7.0 (25) and 6.8 (26), respectively. *Blastocystis* legumain is active over the wide range of pH 4–8

with the optimum pH at 7.5, similar to what has been reported in *T. vaginalis* (23). It has been shown that parasitic cysteine proteases have a broad pH profile and serve various extra-lysosomal functions as opposed to the narrow pH range of mammalian lysosomal cysteine proteases that primarily exert their activity in the lysosome (27). Interestingly, *Blastocystis* legumain has biphasic pH dependence, with peaks at pH 4.0 and 7.5, a property that has not been seen in legumains from all other origins, and is infrequently observed among enzymes in general. Some individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency harbor variant glucose-6-phosphate dehydrogenases that display biphasic pH optimum curves (28, 29). In a study on renin pH dependence, it was shown that Ser-84 of human renin contributes to the biphasic pH dependence of the renin-angiotensinogen reaction (30). This biphasic characteristic was specific for human renin, whereas mouse and rat renins exhibited single peaks. It is presently unclear why *Blastocystis* legumain exhibits two peaks of enzyme activity. The localization of the enzyme on the cell surface and in intracellular compartments is consistent with activity peaks at neutral and acidic pH values. We postulate that *Blastocystis* legumain possesses multiple functions and plays important roles at the cell surface and within acidic compartments. Legumains are generally located within lysosomes of mammalian cells and vacuoles of plant cells but have been reported to localize to the cell surface of metastatic tumors (17) and on the microvillar surfaces of helminth intestinal cells (25). Surface legumains were suggested to activate local zymogens that may aid tumor invasion or participate in helminth alimentary digestion of host proteins. *Blastocystis* cysteine proteases are able to cleave human immunoglobulin A (31) and also induce pro-inflammatory responses in host cells (32). The presence of legumain on the parasite surface may similarly function to activate these proteases. The localization of *Blastocystis* legumain to the cell surface is probably promoted by its uncommon secretory signal peptide. Such a signal peptide has only been explicitly described in the legumain of the Chinese liver fluke *C. sinensis* (19), which was found in the excretory-secretory products as a serological antigen.

*Blastocystis* legumain activity was abolished by the legumain-specific inhibitor APE-RR, an aza-Asn derivative that does not



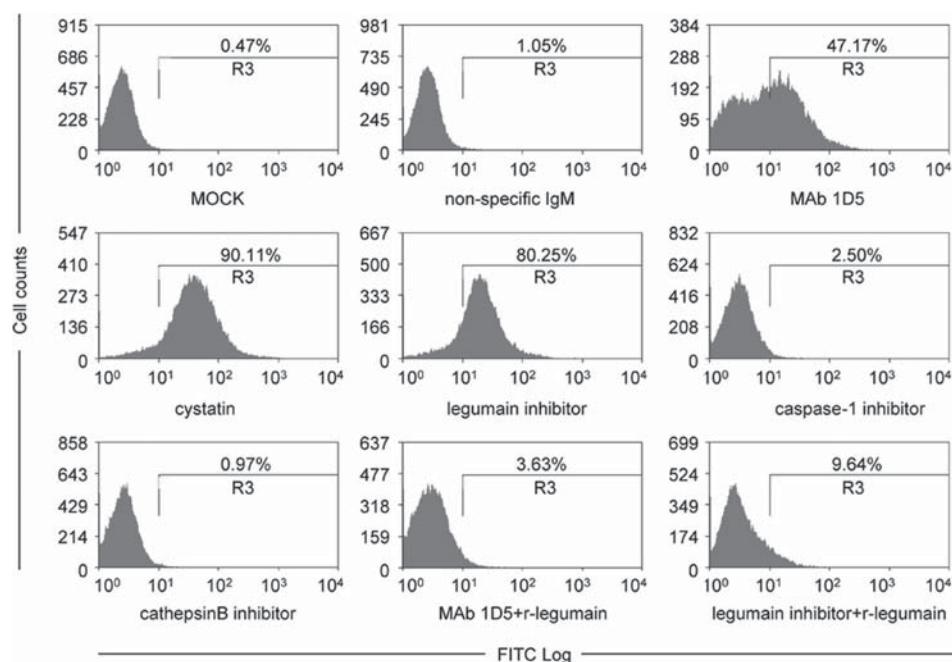


FIGURE 8. **TUNEL apoptosis assays for inhibitor-pretreated cells.** Cells were pretreated under different conditions (cultured with antibody, inhibitors, or neutralized antibody and inhibitor) for 24 h. Fragmented DNA was detected with BrdUTP and labeled with AlexaFluor 488-conjugated anti-bromodeoxyuridine antibody. 20,000 cells were analyzed by a flow cytometer. R3 represents the percentage of apoptotic cells in the total cell population. MOCK control was performed with the same volume of antibody (PBS) or inhibitor (DMSO) diluent. Nonspecific IgM was used as negative antibody control. FITC, fluorescein isothiocyanate.

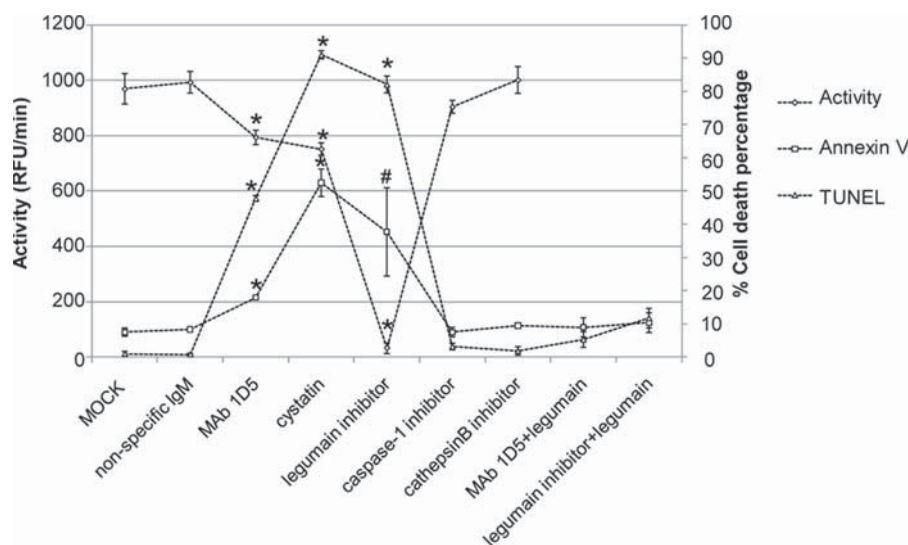


FIGURE 9. **Relationship between *Blastocystis* legumain protease activity and cell death.** Data of purified r-legumain protease activity in the presence or absence of antibody or protease inhibitor was retrieved from Fig. 6 and combined with data on cell death percentages by annexin V and TUNEL apoptosis assays retrieved from Figs. 7 and 8, respectively. Values were means  $\pm$  S.D. (error bars) from two independent sets of experiments in Figs. 7 and 8. \*,  $p < 0.01$  versus MOCK control; #,  $p < 0.05$  versus MOCK control.

cross-react with caspases, papain, and cathepsin (33). It is moderately inhibited by cystatin and mAb 1D5 and weakly inhibited by the caspase-1 inhibitor Ac-YVAD-CMK. Cystatins are potent inhibitors of the papain-like cysteine peptidases in the unrelated family C1 but also inhibit legumain, due to a separate site on the cystatin molecule (34), although plant and mammalian legumains have been shown to cleave caspase-1 substrates (15, 23). Hence, *Blastocystis* legumain shares a number of characteristics with legumains of other origins.

In plants, legumain is essential for hypersensitive-response cell death (15) and is also involved in fungal toxin FB1-induced plant cell death (16). Virus-induced gene silencing of VPE revealed loss of VPE and caspase-1 cleavage activities concomitant with loss of PCD features upon tobacco mosaic virus induction, resulting in increased virus proliferation. Hence, VPE-mediated cell death is important for resistance to pathogen infection. VPE targets that mediate hypersensitive-response cell death are currently unknown (35). In contrast to the plant model, our present studies suggest that *Blastocystis* legumain mediates pro-survival functions. This is evidenced by the significant PS externalization and *in situ* DNA fragmentation upon incubation with legumain inhibitors. There was a positive correlation between the extent of these PCD features with the degree of legumain inhibition (Fig. 9), with legumain-specific inhibitor and cystatin inducing the greatest amount of PS flipping and DNA fragmentation. The data indicate that PCD in *Blastocystis* is regulated by surface legumain activity and suggests a pro-survival role for the surface molecule. However, although cystatin only caused 45% inhibition of *Blastocystis* legumain activity as compared with 90% inhibitory effect by the legumain-specific inhibitor, the extent of cell death induced by cystatin was even higher than that induced by the legumain-specific inhibitor. Because cystatin is also a high affinity inhibitor of family C1 cysteine proteases, it is possible that there is a papain-like cysteine protease downstream of legumain whose inhibition triggers PCD, and by inhibiting both legumain and this hypothetical substrate protease, cystatin causes massive cell death in *Blastocystis*. Because cystatin is a cell-impermeable inhibitor (36), it is thus unlikely that PCD induction was due to inhibition of some other intracellular enzyme. We speculate that *Blastocystis* cell surface legumain may be responsible for processing and activating a downstream cysteine protease, which also localizes at the cell surface and has important function in nutrition uptake. Alternatively, cystatin may independently trigger PCD by inactivating papain-like proteases on the parasite surface. Our previous studies showed

## Protozoan Surface Legumain Involved in PCD

that mAb 1D5 exposure induces PCD features rapidly, as evidenced by PS externalization and caspase-like activity by 2 h post-induction (4, 22), suggesting a direct role for legumain in *Blastocystis* PCD. In this study, it was demonstrated that mAb 1D5 was able to inhibit *Blastocystis* legumain. It is known that enzymes can be inhibited by some of their specific antibodies through mechanisms such as steric hindrance and conformational changes (37). mAbs of different Ig subtypes have been used to study the role of individual cytochrome P450 isoforms. Because of their high specificity and high inhibitory activity, carefully selected mAbs were suggested to be superior to chemical inhibitors to target specific cytochrome P450 enzymes (37). mAb 1D5 is the first reported legumain-specific antibody that has an inhibitory effect on this enzyme. The mechanism by which *Blastocystis* legumain modulates PCD is presently unclear. Human embryonic kidney 293 cells overexpressing legumain appear more resistant to apoptosis compared with cells that have basal levels and is associated with tumor invasion and metastasis *in vivo* (17). More work needs to be done to unravel the pro-survival mechanism of *Blastocystis* legumain and to determine whether it is similar to that of tumor cells. Identification of the substrates of legumain will take us one step further in delineating the legumain-mediated PCD pathway.

This study is the first to provide detailed functional characterization of an unusual protozoan legumain. *Blastocystis* legumain is localized on the cell surface, has biphasic pH optima, and is associated with PCD. As there have only been a handful of protozoan genes shown to be involved in PCD, the identification of a surface protease with a possible pro-survival function sheds new light on the mechanisms of PCD among the unicellular eukaryotes.

**Acknowledgment**—We thank James Powers from Georgia Institute of Technology for the kind gift of legumain inhibitor APE-RR.

## REFERENCES

- Bruchhaus, I., Roeder, T., Rennenberg, A., and Heussler, V. T. (2007) *Trends Parasitol.* **23**, 376–383
- Tan, K. S., and Nasirudeen, A. M. (2005) *Trends Parasitol.* **21**, 547–550
- Nasirudeen, A. M., Tan, K. S., Singh, M., and Yap, E. H. (2001) *Parasitology* **123**, 235–246
- Nasirudeen, A. M., Singh, M., Yap, E. H., and Tan, K. S. (2001) *Parasitol. Res.* **87**, 559–565
- Tan, K. S., Ibrahim, M., Ng, G. C., Nasirudeen, A. M., Ho, L. C., Yap, E. H., and Singh, M. (2001) *Parasitol. Res.* **87**, 534–538
- Tan, S. W., Singh, M., Ho, L. C., Howe, J., Moe, K. T., Chen, X. Q., Ng, G. C., and Yap, E. H. (1997) *Int. J. Parasitol.* **27**, 947–954
- Tan, S. W., Ho, L. C., Moe, K. T., Chen, X. Q., Ng, G. C., Yap, E. H., and Singh, M. (1996) *Int. J. Parasitol.* **26**, 375–381
- Maehr, R., Hang, H. C., Mintern, J. D., Kim, Y. M., Cuvillier, A., Nishimura, M., Yamada, K., Shirahama-Noda, K., Hara-Nishimura, I., and Ploegh, H. L. (2005) *J. Immunol.* **174**, 7066–7074
- Shirahama-Noda, K., Yamamoto, A., Sugihara, K., Hashimoto, N., Asano, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 33194–33199
- Beck, H., Schwarz, G., Schröter, C. J., Deeg, M., Baier, D., Stevanovic, S., Weber, E., Driessen, C., and Kalbacher, H. (2001) *Eur. J. Immunol.* **31**, 3726–3736
- Chen, J. M., Fortunato, M., Stevens, R. A., and Barrett, A. J. (2001) *Biol. Chem.* **382**, 777–783
- Manoury, B., Hewitt, E. W., Morrice, N., Dando, P. M., Barrett, A. J., and Watts, C. (1998) *Nature* **396**, 695–699
- Chen, J. M., Rawlings, N. D., Stevens, R. A., and Barrett, A. J. (1998) *FEBS Lett.* **441**, 361–365
- Li, D. N., Matthews, S. P., Antoniou, A. N., Mazzeo, D., and Watts, C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 38980–38990
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2004) *Science* **305**, 855–858
- Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 32914–32920
- Liu, C., Sun, C., Huang, H., Janda, K., and Edgington, T. (2003) *Cancer Res.* **63**, 2957–2964
- Chen, J. M., Fortunato, M., and Barrett, A. J. (2000) *Biochem. J.* **352**, 327–334
- Ju, J. W., Joo, H. N., Lee, M. R., Cho, S. H., Cheun, H. I., Kim, J. Y., Lee, Y. H., Lee, K. J., Sohn, W. M., Kim, D. M., Kim, I. C., Park, B. C., and Kim, T. S. (2009) *Proteomics* **9**, 3066–3078
- Tan, K. S. (2008) *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 639–665
- Nasirudeen, A. M., and Tan, K. S. (2005) *Biochimie* **87**, 489–497
- Nasirudeen, A. M., and Tan, K. S. (2004) *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 477–482
- Rotari, V. I., Dando, P. M., and Barrett, A. J. (2001) *Biol. Chem.* **382**, 953–959
- León-Félix, J., Ortega-López, J., Orozco-Solís, R., and Arroyo, R. (2004) *Gene* **335**, 25–35
- Oliver, E. M., Skuce, P. J., McNair, C. M., and Knox, D. P. (2006) *Parasitology* **133**, 237–244
- Dalton, J. P., Hla-Jamriska, L., and Brindley, P. J. (1995) *Parasitology* **111**, 575–580
- Sajid, M., and McKerrow, J. H. (2002) *Mol. Biochem. Parasitol.* **120**, 1–21
- Aksoy, K., Yüregir, G. T., Dikmen, N., and Unlüktürk, I. (1987) *Hum. Genet.* **76**, 199–201
- McCann, S. R., Smithwick, A. M., Temperley, I. J., and Tipton, K. (1980) *J. Med. Genet.* **17**, 191–193
- Iwata, H., Nakagawa, T., Nishiuchi, K., Hiratsuka, T., Satou, R., Yoshioka, Y., Fukui, Y., Suzuki, F., and Nakamura, Y. (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1279–1285
- Puthia, M. K., Vaithilingam, A., Lu, J., and Tan, K. S. (2005) *Parasitol. Res.* **97**, 386–389
- Puthia, M. K., Lu, J., and Tan, K. S. (2008) *Eukaryot. Cell* **7**, 435–443
- Asgian, J. L., James, K. E., Li, Z. Z., Carter, W., Barrett, A. J., Mikolajczyk, J., Salvesen, G. S., and Powers, J. C. (2002) *J. Med. Chem.* **45**, 4958–4960
- Alvarez-Fernandez, M., Barrett, A. J., Gerhartz, B., Dando, P. M., Ni, J., and Abrahamson, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 19195–19203
- Lam, E. (2005) *Trends Cell Biol.* **15**, 124–127
- Claveau, D., Riendeau, D., and Mancini, J. A. (2000) *Biochem. Pharmacol.* **60**, 759–769
- Gelboin, H. V., and Krausz, K. (2006) *J. Clin. Pharmacol.* **46**, 353–372



## **II. Annexe 2**

### **Liste des protéines potentiellement importées aux MLOs de *Blastocystis* sp.**



Pathway/component	Gene product	Target peptide	Putative mitochondrial leader peptide	Mitoprot score	Mitopred score
Genetic information processing					
Transcription	Transcription initiation factor TFIID (subunit D5)	-		0.5321	92,30%
	RNA-3'-phosphate cyclase	+	MRYITFKGPEQLRYRIIVATLTRK	0.5034	99,00%
	DNA-directed RNA polymerase	+	MFALRCKHYAITHGLQRLFTTALFSRHFFQRF	0.9979	99,00%
	Small nuclear ribonucleoprotein	+	MLSRFASRGHPTFSAMNRLSLQRQFANAKKKS	0.9716	99,00%
Translation	Ribosomal protein S2	mloDNA	/		
	Ribosomal protein S3	mloDNA	/		
	Ribosomal protein S3a	+	MAIGKKFLFLSANRFLGKSQKKV	0.8625	92,30%
	Ribosomal protein S4	mloDNA	/		
	Ribosomal protein S7	mloDNA	/		
	Ribosomal protein S8	+	MLMNVLANALKSITNAEKRGRQVLVRP	0.7435	92,30%
		+	MNVLANALKSITNAEKRGRQVLVRP	0.7883	92,30%
		mloDNA	/		
	Ribosomal protein S8e	+	MGRQPAMTKLGAKRIYLVRCRGGNIKHRAIRL	0.9553	99,00%
		+	MGRQPAMTKLGAKRIYLVRCRGGNIKHRAIRL	0.9553	99,00%
		+	MTKLGAKRIYLVRCRGGNIKHRAIRL	0.8605	99,00%
		+	MTKLGAKRIYLVRCRGGNIKHRAIRL	0.8608	99,00%
		+	MTKLGAKRIYLVRCRGGNIKHRAIRL	0.8605	99,00%
		+	MTKLGAKRIYLVRCRGGNIKHRAIRL	0.8608	99,00%
		+	MTKLGAKRIYLVRCRGGNIKHRAIRL	0.8605	99,00%
	Ribosomal protein S9	+	MSTEAKPSVQCFGRKKNAVAVAHCKYGKGVLR L	0.6172	84,60%
		+	MSTEAKPSVQCFGRKKNAVAVAHCKYGKGVLR L	0.6172	84,60%
	Ribosomal protein S10	mloDNA	/		
	Ribosomal protein S11	mloDNA	/		
	Ribosomal protein S12	mloDNA	/		
	Ribosomal protein S13	mloDNA	/		
	Ribosomal protein S14	mloDNA	/		
	Ribosomal protein S15	+	MGRMYGKGKGISASCLPYKRT	0.5063	99,00%
		+	MGRMYGKGKGISASCLPYKRT	0.5063	99,00%
		+	MGRMYGKGKGISASCLPYKRT	0.5063	99,00%
	Ribosomal protein S16	+	MPVVIRLARLRGRHLPFYRIRV	0.9848	99,00%
		+	MPVVIRLARLRGRHLPFYRIRV	0.9848	99,00%
	Ribosomal protein S17	+	MATVPKVARY	0.6973	92,30%
	Ribosomal protein S17e	+	MLFGGFVASFSWRGRVRTKTVKRT	0.5575	99,00%
	Ribosomal protein S19	mloDNA	/		
	Ribosomal protein S24e	+	MSEAAVTVRVRKFMRNPLLKRRQ	0.9187	99,00%
	Ribosomal protein S26e	+	MPFKRRNHGRSKKGRGHVKPVRCTHCGRG	0.7031	92,30%
	Ribosomal protein S28e	+	MLAVVDKVLGRTGNTGNVTQVRVTFMDSSKRS IVRNVKGP	0.8995	99,00%
		+	MHAVVDKVLGRTGNTGNVTQVRVTFLDASKRS IVRNVKGP	0.7522	99,00%



Ribosomal protein L1	+	MLRATRPFCLFLLASQFRFCGTSMAGARKNPG RIYYSPQLQAVTCVRN	0.9902	92,30%
Ribosomal protein L2	+	MGRVIRGQRKGAKGAVFQAHTHLRKGVPQFRA LDYSERNG	0.9706	99,00%
	+	MGRVIRGQRKGAKGAVFQAHTHLRKGVPQFRA LDYSERNG	0.9706	99,00%
	+	MGRVIRGQRKGAKGAVFQAHTHLRKGVPQFRA LDYSERNG	0.9706	99,00%
	+	MGRVIRGQRKGAKGAVFQAHTHLRKGVPQFRA LDYSERNG	0.9706	99,00%
	+	MGRVIRGQRKGAKGAVFQAHTHLRKGVPQFRA LDYSERNG	0.9706	99,00%
	+	MGRVIRGQRKGAKGAVFQAHTHLRKGVPQFRA LDYSERNG	0.9706	99,00%
	+	MGRVIRGQRKGAKGAVFQAHTHLRKGVPQFRA LDYSERNG	0.9706	99,00%
	+	MGRVIRGQRKGAKGAVFQAHTHLRKGVPQFRA LDYSERNG	0.9706	99,00%
	+	MGRVIRGQRKGAKGAVFQAHTHLRKGVPQFRA LDYSERNG	0.9706	99,00%
Ribosomal protein L5	mloDNA	/		
Ribosomal protein L6	mloDNA	/		
Ribosomal protein L6e	+	MSRVVPKFFQVRAPATEKPKPTKLRSITAGT VLILLAGRY	0.9506	99,00%
Ribosomal protein L10e	+	MGRRPARCYRYCKNKPYIKSRFCRG	0.9407	92,30%
	+	MGRRPARCYRYCKNKPYIKSRFCRG	0.9407	92,30%
Ribosomal protein L11	+	MSKPVLTAICIRLRI	0.6734	99,00%
Ribosomal protein L12	mloDNA	/		
Ribosomal protein L14	mloDNA	/		
Ribosomal protein L15	+	MVTRIRSFSAFPSRFSKNRKARGHVSAGHGRI GKHRCHPSGRG	0.9899	99,00%
Ribosomal protein L16	mloDNA	/		
Ribosomal protein L17	+	MKHRVIFRKLGRKTSHTAMLRNLTTSLIEH	0.9973	99,00%
Ribosomal protein L18a	+	MRLFAPNPVTA	0.8329	99,00%
	+	MRLFAPNPVTA	0.8329	99,00%
Ribosomal protein L18e	+	MGMGIDLAVAGGRNCGHKKRQAPKSENVYLALL VNLYRFLARRTNAR	0.6966	84,60%
Ribosomal protein L19	+	MLGVYSNQLIRGISRTIPRAFAACFASA	0.9832	99,00%
	+	MVSLKLQKRL	0.6183	92,30%
	+	MVSLKLQKRL	0.6183	92,30%
Ribosomal protein L20	+	MGEVAHQYHKKI I KLAGYRGRQKNCYRIAIR SVIKAQARSYVGRKLKRDMSRLWIQRINAAS RLFGTNYNHL	0.9523	99,00%
Ribosomal protein L21	+	MPHANGYRARTRYMFKRAFRC	0.9923	99,00%
Ribosomal protein L21	+	MYITRPVGRFGLQLLRKQVPAFSCNASQRWFS DKVTPE	0.9352	99,00%
Ribosomal protein L24	+	MQNMKRLVHPVIKHRM	0.5965	92,30%
Ribosomal protein L25	+	MFSSVRIGASLAPRIIEGLRPFSKAVSQK	0.8606	99,00%
Ribosomal protein L27	+	MLHGSVFCLFCRFAHNQSGGKTLNGRDSNPKY LGLKKFGGEKVIPGNIIMRQRGTFHHPGGVG MGRD	0.5517	84,60%
Ribosomal protein L32e	+	MSPARKVKIVKKRTVSFPRFQADKFKRMNQHW RKPKGIDGRCRRRFRG	0.9096	99,00%
	+	MSPSRKIIVKKRTVSFPRFQADKFKRMNQHW RKPKGIDGRCRRRFRG	0.9096	99,00%
	+	MSPARKVKIVKKRTVSFPRFQADKFKRMNQHW RKPKGIDGRCRRRFRG	0.9096	99,00%
Ribosomal protein L34e	+	MVANRRVTYRRRHSYNTASNRIEVVKTTPGARL TAHYIEKSVQAPKCRCKKVLPGIPRLRR	0.9824	84,60%

		+	MVANRRVITYRRRHSYNTASNRIEVVKTPGARL TAHYIEKSVQAPKCRCKKVLPGIPRLRR	0.9824	84,60%
	Ribosomal protein L35a	+	MPKHSNKLYVKGVFLGYRRS	0.9583	99,00%
	Ribosomal protein L35a	+	MPYRHPKLCVKGVFMYRRS	0.9814	99,00%
	Ribosomal protein L37e	+	MSVFFVVLKNVTKGTSSFGKRHTKHTICRRR GRRAFHIQKSRCGSCGYPDAKMRHYNWALKSS RRRGQGTGRMSYLKTMTRRFKNGFRE	0.9972	99,00%
	Ribosomal protein L37e	+	MRHYNWALKSSRRRGQGTGRMSYLKTMTRRFK NGFRE	0.98	99,00%
	Ribosomal protein L37ae	+	MRSRGVTLVQLKSAMGKRTKKVGICGKYGTRY GSSLRKIVKKIEISQHGTYTCAFCGKNTVKRT	0.9837	84,60%
	Ribosomal protein L39e	+	MRQNRPLPQWFRLRTGNTIRY	0.9752	99,00%
	Ribosomal protein L4/L1e	+	MVGGAARPVVSVSVETANKIVSTVPLPSVFT APIRTDVVQFVHTNLNKNHRQPYAVFKRAGHQ HSAISWGTGRAVARVPRVSGGTARSGQGAFA NMCCKGRMFAPTKIWR	0.9941	99,00%
	Ribosomal protein L7/L12	+	MFARQCVYGCKRILSYGSEFGFSRSSASAVRY LTRCAVPRTVSPVAQRYFSTESAACK	0.9839	84,60%
	Ribosomal protein L14b/L23e	+	MAAKRGRGGAAGNKFKMSLGLPAGAIMNCADN TGAKNLYVISVYGIGARLNRL	0.5567	99,00%
		+	MAAKRGRGGAAGNKFKMSLGLPAGAIMNCADN TGAKNLYVISVYGIGARLNRL	0.5567	99,00%
	Ribosomal protein L19/L19e	+	MVSLKLQKRL	0.6183	92,30%
	Ribosomal protein L37a/L37e	+	MRHYNWALKSSRRRGQGTGRMSYLKTMTRRFK NGFRE	0.98	99,00%
	Like-Sm ribonucleoprotein, core	+	MLSRFASRGHPTFSAMNRLSLQRQFANAKKS	0.9716	99,00%
<b>Electron transport chain (ETC)</b>					
<b>Complex I</b>					
	subunit NuoA (ND3)	mloDNA	/		
	subunit NuoB (NDUFS7)	+	MQRIITSAAARVA	0.9885	99,00%
	subunit NuoC (NDUFS3)	mloDNA	/		
	subunit NuoD (NDUFS2)	mloDNA	/		
	subunit NuoE (NDUFV2)	+	MFRALTSVSSRV	0.883	92,30%
	subunit NuoF (NDUFV1)	+	MQTLTLTRGIRSCVSKPSVYRVVARSAAGPAA P	0.997	92,30%
		+	MQGEIPIFSSLNRMQTLIRGTRTYLGKPSVF RAIARSFAAGPAAP	0.9611	84,60%
	subunit NuoG (NDUFS1)	mloDNA	/		
	subunit NuoH (ND1)	mloDNA	/		
	subunit NuoI (NDUFS8)	+	MLSQLASRSARLVNVSSVRCFSAFAPTA	0.8802	99,00%
	subunit NuoJ (ND6)	mloDNA	/		
	subunit NuoK (ND4L)	mloDNA	/		
	subunit NuoL (ND5)	mloDNA	/		
	subunit NuoM (ND4)	mloDNA	/		
	subunit NuoN (ND2)	mloDNA	/		
	subunit NDUFA2	-			
	subunit NDUFA5	+	MFVSRVLCCTLKRT	0.8666	99,00%

		+	MQCDMGWFMTCCRMFVTRALCSMVKRT	0.848	84,60%
	subunit NDUFA6	+	MPAYQTLMEMGPALTSRAASAKAVRLYKAIVKQLPRIISTYQMNL	0.6101	99,00%
	subunit NDUFA9	+	MLRTLVMKNSLRVLSRSITSDMIPGTVGLGGRMSQCPLKVTIFGASTGNLGRSVVYELASRGVTCMIPYRG	0.9968	92,30%
	subunit NDUFB9	-			84,60%
	subunit NDUFA12 isoform CRA_a	-		0.9516	99,00%
<b>Complexe II</b>	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (SDHA)	+	MGKTAPALTRAFRATACRS	0.9202	92,30%
		+	MGKTAPALTRAFRATACRS	0.9202	92,30%
		+	MGKTAPALTRAFRATACRS	0.9202	92,30%
		+	MLPSCRILGKTAPALTRAFRATACRS	0.9552	92,30%
	Succinate dehydrogenase iron-sulphur subunit (SDHB)	+	MLVKSFTROPFLQSAQRL	0.88	84,60%
	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 (SDHC)	+	MKASPVLFQRPLSYIEEQY	0.2121	
	Succinate dehydrogenase cytochrome b small subunit (SDHD)	+	MAMTMRALRLGQMSAKSISCYASSVAPVFVRF	0.9417	
<b>Ubiquinone biosynthesis</b>	Ubiquinone biosynthesis protein	+	MSSIAMRLPRTLRVSRFLKCRM	0.9984	92,30%
<b>Fe/S cluster assembly</b>					
	Monothiol glutaredoxin (Grx5)	+	MYRSLAAIQLSRQLFKSYSRLPRVFFSSQSAD	0.9956	99,00%
	Mitoferrin (Mrs3/Mrs4)	-			
	Cysteine desulfurase Nfs1	-			
	Scaffold protein Isu1	+	MFTFVKGVVPKAQRL	0.9816	99,00%
		+	MFSLARSAPRFVFAARSLTCTTRY	0.9902	99,00%
	Scaffold protein Isa2	+	MYRFVSSTRLVTFIFSRSTKVINS	0.9957	92,30%
	Heat shock protein 70 (Hsp70)	-			
	Heat shock protein 40	+	MFHFARSATRGLSNYLLGAMQARLLLRQSQNVFTRSLFGFGGSPGNMGCRG	0.9845	92,30%
		+	MLGAFARKAISTVGMRLGLQLNRNFLVPMHGQLSSNGLFGRHMSSTRD	0.9849	99,00%
	Nucleotide exchange factor Mge1	+	MLTPLLSACSIVWSLLLFVTPADGRPLYRSFHPA	0.4672	
	P-loop NTPase Ind1	-			
	Ferredoxin	+	MLALCPLTALARGVVSRGFVTIHFT	0.6646	
	Frataxin	-			
<b>Mitochondrial protein import</b>					
<b>Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane (TOM)</b>	Tom70	-			
<b>Sorting and Assembly Machinery of the Outer Mitochondrial Membrane (SAM)</b>					

	Sam50	-			
<b>Mitochondrial Intermembrane Space Import and Assembly (MIA)</b>	Erv1	+	MFSRLFSARPIIARAGIRIRSGVSNPCRWIAHSSVRM	0.9978	84,60%
<b>Intermembrane Space Chaperones</b>					
	Tim9-Tim10	-			
	Tim8-Tim13	-			
<b>Carrier Translocase of the Inner Mitochondrial Membrane (TIM22)</b>	Tim22	-			
<b>Presequence Translocase of the Inner Mitochondrial Membrane (TIM23)</b>	Tim23	-			
	Tim17	-			
	Tim50	-			
	Tim21	-		0.8144	84,60%
<b>Presequence Translocase-Associated Motor (PAM)</b>	Heat shock protein 70 (Hsp70)	-			
	Nucleotide exchange factor Mge1	+	MLTPLLSACSIWVSLLLFVTPADGRPLYRSFHPA	0.4672	
	Pam18	+	MFHFARSATRGLSNYLLGAMQARLLLRQSQNVFTRSLFGFGGSPGNMGCRG	0.9845	92,30%
	Pam16	+	MFANAIRTSIKALRVPAVVPLRSMMTCTNYRPNTNLHRSHPGQLYVQRRFTWGPVVRLFTQLAASL	0.9974	84,60%
	Mdj2	-		0.88	
<b>Mitochondrial Processing Peptidases</b>	Mitochondrial-processing peptidase (subunit $\alpha$ )	+	MLRIGATTQRLVRSTLRY	0.9944	99,00%
	Mitochondrial-processing peptidase (subunit $\beta$ )	+	MLSRIIHNPRLLVPSRNLLRAFSSSLPSYLFNVPADEVTTLPNGVRVLSQGGYGK	0.9727	92,30%
	Oct1	-		0.4925	
	Imp1-Imp2	-			
	m-AAA (Yta12)	-			
	m-AAA (Yta10)	-			
<b>Mitochondrial Export Machinery</b>	Oxa1	-			
	Mdm38	-			
	Cpn60	+	MQRVASRGSTLIRRCFATGKELK	0.9942	99,00%
		+	MQRVASRGSTLIRRCFATGKELK	0.9942	99,00%
	Cpn10	-			
	hsp78	+	MLTKATKLMFTARPLLTLSRS	0.9399	92,30%
	Zim17	-			
<b>Pyruvate metabolism</b>					

	Pyruvate Dehydrogenase E1 (subunit $\alpha$ )	+	MLTCAVGKTLPRQLIRAFSSKTFTV	0.9974	99,00%
	Pyruvate Dehydrogenase E1 (subunit $\beta$ )	+	MLALSRAARLSCGSIIRTFSSAGAVAN	0.9942	99,00%
	Pyruvate Dehydrogenase E2 (dihydrolipoamide acetyltransferase)	+	MLSRFAVATRSGVTAVNLLSRTHGSVSHIIRC FASSLPEH	0.9348	99,30%
		+	MFATRLVNSVIRSSNIKLVRLEFNSEYTKHFLM PAAARLVALNNLDASSIVGTGLGGRIMRY	0.9682	92,30%
	Pyruvate Dehydrogenase E3 (dihydrolipoamide dehydrogenase)	-			
	Pyruvate:Ferredoxin (flavodoxin) Oxidoreductase (PFO)	+	MFSTCAKRAVCGISRF	0.9837	99,00%
		+	MFSTCAKRAVCGISRF	0.9841	99,00%
		+	MLAVALKQSFQRQSAMLAGSLNGSVAKSTFTRL FSEYKKVR	0.8813	99,00%
		+	MLAVALKQSFQRQSAMLAGSLNGSVAKSTFTRL FSEYKKVR	0.8813	99,00%
	Pyruvate:NADP+ Oxidoreductase (PNO)	+	MTPFRIHSFFQPYLVSKYCPRTIVFRHSL LCS RNRTVELWNRIIFFSITKV	0.9627	84,60%
	Pyruvate Carboxylase (subunit $\alpha$ )	+	MFKLGTSSSILSKCGWRLLSKRSFEK	0.9876	84,60%
	Pyruvate Carboxylase (subunit $\beta$ )	+	MITCPMPGSVCRVLVKNGEKV	0.5951	84,60%
	Acetate:succinate CoA Transferase (ASCT)	-			
	Succinyl-CoA Synthetase subunit $\alpha$ (SCS $\alpha$ )	+	MLSCVSKVSRIGLSVARA	0.6578	99,00%
		+	MLSSVSKVSRIGLSVARA	0.6678	99,00%
		+	MLSSVSKVSRIGLSVARA	0.6678	99,00%
	Succinyl-CoA Synthetase subunit $\beta$ (SCS $\beta$ )	+	MFTRGLIAASTKTYVSSMLKMAPKAVGAVRNL NIHEWQSKQLIQKYGGRA	0.924	99,00%
	Ferredoxin	+	MLALCPLTALARGVVSRRGFVTIHFHT	0.6646	
	Malate Dehydrogenase (MDH)	+	MFASRSVAVAKAFTRA	0.9928	99,00%
		+	MFARTFSRAVRSFSTGAKVA	0.9934	99,00%
	Fumarate Hydratase	+	MHFRFPFFPSFHIYRYSSPFFLKIAYSLLRM SALIRSAPKAAAASRIFLRGAATRT	0.9946	84,60%
	Iron-hydrogenase	+	MLSALSSFVRRSFLAAASCRSFAAAAQGN	0.9911	92,30%
	Iron hydrogenase assembly protein	+	MIPCFARRACRFTRLLSTATGNA	0.9953	99,00%
<b>Propionate metabolism</b>					
	Methylmalonyl-CoA mutase	+	MLAATRQLAKTSVRA	0.929	92,30%
	Methylmalonyl-CoA epimerase	+	MLANFARRAFATAKPYRILGIQQIAI	0.9689	99,00%
	Propionyl-CoA carboxylase subunit $\alpha$	+	MRFHVSYIIFALYCSLNLIRTMFGRSFSGIRS VSKLARSFATEGELP	0.9978	99,00%
		+	MFGRSFSGIRGVSKLARSFATEGELP	0.9582	92,30%
		+	MFGRSFSGIRGVSKLARSFATEGELP	0.9582	92,30%
		+	MFGRSFSGIRGVSKLARSFATEGELP	0.9582	92,30%
		+	MFGRSFSGIRGVSKLARSFATEGELP	0.9582	92,30%
		+	MFGRSFSGIRGVSKLARSFATEGELP	0.9582	92,30%

	Propionyl-CoA carboxylase subunit $\beta$	+	MISKRAVTLARSFAGAVDLT	0.8317	92,30%
		+	MISKRAVTLARSFAGAVDLT	0.8317	92,30%
		+	MISKRAVTLARSFAGAVDLT	0.8317	92,30%
		+	MISKRAVTLARSFAGAVDLT	0.8317	92,30%
		+	MISKRAVTLARSFAGAVDLT	0.8317	92,30%
		+	MISKRAVTLARSFAGAVDLT	0.8317	92,30%
		+	MISKRAVTLARSFAGAVDLT	0.8317	92,30%
		+	MISKRAVTLARSFAGAVDLT	0.8317	92,30%
		+	MISKRAVTLARSFAGAVDLT	0.5593	92,30%
<b>Fatty acid metabolism</b>					
<b>Beta oxidation</b>	Enoyl-CoA hydratase	+	MQTSLTRRLRLGLVSVAL	0.6704	99,00%
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	+	MVSKSKRTHSLDLFVNVLNKNVIGYFNMVRL	0.9193	84,60%
	Long-chain acyl-CoA synthetase	+	MLSRFSVLKTRNVVRALSTSLKSY	0.9945	99,00%
<b>Fatty acid biosynthesis</b>	trans-2-enoyl-CoA reductase	+	MAAIAVLKNSMLKPSLCRFAGTVNAAVFQKYGNPTNVLRQ	0.9883	92,30%
	Biotin carboxylase	-		0.9779	84,60%
	Acetyl-CoA carboxylase	-			
	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	+	MSQVCIISGCSRIGIGKAIATT	0.9002	99,00%
	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	-			
	2-enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase	+	MLANKVVLVTGIANGRSIAWNIKK	0.8534	92,30%
	Acyl carrier protein	+	MSAIVFSSVRLRTPIFIRS	0.7049	92,30%
<b>Amino acid metabolism</b>					
<b>Glutamate metabolism</b>	Glutamine synthetase	-		0.9203	99,00%
	Glutamyl-tRNA synthetase	+	MPFPFSFVRFASTTRVRF	0.8672	92,30%
	Aspartate aminotransferase	+	MFAKVVKFARPTVYRSFATSRWAA	0.9906	92,30%
<b>Alanine and aspartate metabolism</b>	Aspartate ammonia-lyase	+	MHFRFPFFPSFHIYRYSSPFLKIAYSLLRMSALIRSAPKAAAASRIFLRGAATRT	0.9946	84,60%
		+	MSALIRSAPKAAAASRIFLRGAATRT	0.9481	99,00%
	Aspartyl-tRNA synthetase	+	MLARRAYFSLKFSSRLFRSLSSKADAF	0.9985	92,30%
	Alanyl-tRNA synthetase	+	MLLCSGRELSRRIFKSRSPV	0.9424	99,00%
	Asparagine synthetase	-		0.5478	84,60%
	Aspartate aminotransferase	+	MFAKVVKFARPTVYRSFATSRWAA	0.9906	92,30%
	Alanine aminotransferase 2	+	MLRIVNRFSLPTLRSFSSRITID	0.9868	84,60%
		+	MLRIVNRFSLPTLRSFSSRITID	0.9868	84,60%
		+	MLRIVNRFSLPTLRSFSSRITID	0.9868	84,60%
		+	MLRIVNRFSLPTLRSFSSRITID	0.9868	84,60%
<b>Glycine, serine, threonine metabolism</b>					

	Threonine synthetase	-		0.5825	84,60%
	Threonine dehydrogenase	+	MLATAAKATFSAARTFATANAPR	0.9081	99,00%
		+	MLATAAKATFSAARTFATANAPR	0.9081	99,00%
	Glycine hydroxymethyltransferase	+	MISALSRISIRLSAARI	0.9732	99,00%
	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	+	MQASRFVRAFASAAKPKILVTRQIPAPAMKM	0.9832	99,00%
	Glycine dehydrogenase	+	MQSLIRSALRRRTGSLAVVARFASTRPFAPVFN FV	0.9975	99,00%
	Aminomethyltransferase	+	MLATVAKTFTRPAIRAFSVSANIA	0.992	99,00%
	Glycyl-tRNA synthetase	+	MVRSFSTNVVDIGGIRASLTRQ	0.8176	99,00%
Methionine metabolism	Phosphatidylserine decarboxylase	+	MFTVVVRATRATSGKAISRCLFASAKSSKPFYR RFITPTTVGL	0.9975	99,00%
	Methionyl-tRNA synthetase	+	MLRSFSSFLRRGGSLARF	0.9535	84,60%
Cysteine metabolism	Cysteinyl-tRNA synthetase	+	MICRLKLFQRQIRSFSTVLPRL	0.9965	92,30%
	Aspartate aminotransferase	+	MFAKVVKFARPTVYRSFATSRWAA	0.9906	92,30%
Valine, leucine, isoleucine metabolism	Branched-chain amino acid aminotransferase	+	MSLSALHRSSLTLGMTVARFSSTFNII	0.9814	99,00%
	Leucyl-tRNA synthetase	+	MLKVAITGTKRIQHARLFACLRGFSTTAEAA	0.7923	92,30%
	Isoleucyl-tRNA synthetase	+	MSQKIGKAASKIFSKTINSPKTSFPMFANPAL REKPYLKRCTSGMYMTPMKYCNVDLYNWQKQARS	0.9394	92,30%
	Valyl-tRNA synthetase	-		0.9153	92,30%
Valine, leucine, isoleucine degradation	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	+	MLTSRLLHSGRALVPCFISPIILFGNNQLITRK LVNAFSTN	0.9559	92,30%
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	+	MVSKSKRTHSLDLFVNVLNKNVIGYFNMVRL	0.9193	84,60%
	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	-		0.6995	84,60%
Lysine metabolism	Diaminopimelate decarboxylase	-			
	Lysyl-tRNA synthetase	+	MAAVASRGFSKVVENN	0.7542	92,30%
Arginine, proline metabolism	Prolyl-tRNA synthetase	-		0.9737	84,60%
	Aspartate aminotransferase	+	MFAKVVKFARPTVYRSFATSRWAA	0.9906	92,30%
Histidine metabolism	Imidazolonepropionase	-		0.814	92,30%
Phenylalanine, tyrosine metabolism	Phenylalanyl-tRNA synthetase	+	MLSRSFYVCYSASKRSFVNLVKFI	0.9337	99,00%
	Tyrosyl-tRNA synthetase	-		0.6259	84,60%
	Tyrosyl-tRNA deacylase	+	MRVVLQRVLSASVTVD	0.9082	99,00%

<b>Nucleotide metabolism</b>					
<b>Purine metabolism</b>	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	+	MWSKLFGCSVKQTARFVNRRANSPLLRKALTRV QSTGTNQASWNVGGILGAGALGLTCCYLTSRA FAQSKDNE	0.9982	99,00%
	DNA-directed RNA polymerase II	+	MNGAVNPSTTKLFRVRKTVFKMLSKRGY	0.9551	99,00%
	Adenylate kinase	+	MSFYKNLNLVALHLKRKNILFIGAPGSGKGTYS RIISPILMIP	0.8453	92,30%
	Adenosine deaminase	+	MKKA EKAFQNQIVTRLVLSINRS	0.9195	92,30%
<b>Pyrimidine metabolism</b>					
	Dihydroorotate oxidase	+	MFCRFSRVAPRLTRSFSSGTS AK	0.9955	99,00%
	DNA-directed RNA polymerase II	+	MNGAVNPSTTKLFRVRKTVFKMLSKRGY	0.9551	99,00%
	Thymidylate synthase	+	MSIIRFSIVAAMTTKRIGIGLNGGLP	0.8795	99,00%
	Pseudouridylate synthase	+	MRCVVPYIYKHETFCQRWFGKKIIDV	0.572	84,60%
<b>Histone proteins</b>					
	Histone H3	+	MARTKQTARKSTGGKVPRKQLATKAARKSSPA AGAVKKPHRYRP	0.997	92,30%
		+	MARTKQTARKSTGGKVPRKQLATKAARKSSPA AGAVKKPHRYRP	0.997	92,30%
		+	MARTKQTARKSTGGKVPRKQLATKAARKSSPA AGAVKKPHRYRP	0.997	92,30%
		+	MARTKQTARKSTGGKVPRKQLATKAARKSSPA AGAVKKPHRYRP	0.997	92,30%
		+	MARTKQTARKSTGGKVPRKQLATKAARKSSPA AGAVKKPHRYRP	0.997	92,30%
		+	MARTKQTARKSTGGKVPRKQLATKAARKSSPA AGAVKKPHRYRP	0.997	92,30%
	Histone H4	+	MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKV MRDNILGITK PAIRRLARRGGVKRI	0.9828	92,30%
		+	MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKV MRDNILGITK PAIRRLARRGGVKRI	0.9828	92,30%
		+	MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKV MRDNILGITK PAIRRLARRGGVKRI	0.9828	92,30%
		+	MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKV MRDNILGITK PAIRRLARRGGVKRI	0.9828	92,30%
	Histone H2A	+	MSGKGKKGGRG	0.9264	92,30%
		+	MSGKGKKGGRG	0.9264	92,30%
		+	MSGKGKKGGRG	0.9297	99,00%
		+	MSGKGKKGGRG	0.9297	99,00%
		+	MTRSTKAGLQFPVGRIHRFLKGRVSSRQRV	0.9623	99,00%
<b>Transporters/carriers</b>					
	2-oxoglutarate/malate carrier protein	+	MSNKNSIAYTLRPYIAGGSGAIFSSICHPID LVKVRLQVANTAAEGRISGMAIAKSVVRNEGV RGLFSGLSAAIARQ	0.8238	99,00%
	ABC transporter type 1	+	MWMYAESQSIRMGGKIRAMVSDAIYRKAFTLS SVSRC	0.6342	84,60%
		+	MMMIVKIGVGMKSMVSEAIYRKALRLTSTAKG STSTGQLVNI MSNDTNSLLMFM MMVTVIIMVP FMLVICVVLVASMMGVLTWVAIAIYFVMLIIQ FCVVGVS RPVRR	0.8329	99,00%
	ABC transporter, putative	+	MCKRYLTRQWTMTKTVIQSPLGYLSASGGVVNV VSRN	0.9951	92,30%
	Arginine/ornithine transport system ATPase	+	MFSC LGRSLSR AIPRCHAAAGCSIRLFGTQYS VE	0.9962	99,00%



	ATP/ADP translocator	+	MGKHQDRRLTFWQNFIAGGIAGVGSRTFTSPL DVVKIICQVGSKQHTGFIGTFKNVYSQEGKGF FWKGNVACVRLFPYSAINF	0.4117	99,00%
	UAA transporter	+	MIPVMLAGTLFGTRKY	0.8551	92,30%
Oxygen salvage					
	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	+	MFMIKPKFSKAVATAGRRFAAPAAFARCFSQIT YGP	0.9909	99,00%
	Thioredoxin	+	MTAARMNRMLFASALSSAKMLPQLRCFASAAD KL	0.9594	92,30%
	Glutathione peroxidase	+	MIYQFVFRDITGASVAFSQFRG	0.5373	84,60%
	Glutathione reductase	-		0.7529	84,60%
	Superoxide dismutase	+	MYMKSFSVSVIKSASLLRSFATAPYVIRALPYA KNAL	0.9737	99,00%
	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-		0.5269	
	Alternative oxydase (AOX)	+	MFSRFCRSRLTSRVPPFIRA	0.9557	99,00%
Others					
	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	+	MLRVNIAKRFFSAFPKGRKIVIVGGVA	0.9825	99,00%
	Acyl-CoA N-acyltransferase	+	MINIKVTHSSVWNSQTSFRFMNILYRQ	0.7953	84,60%
		+	MKNRGDSIIANNTHNQKRIVQRM	0.9122	84,60%
	Acetyl CoA synthetase subunit $\alpha$	+	MFVRRLAAFKPMPPFARMFTSSIKDY	0.9826	99,00%
		+	MLSRFSFVLKTRNVVRALSTSLKSY	0.9944	99,00%
		+	MLAGRFLWNCRRVCVRSFASSLKDI	0.9926	92,30%
	Biotin-acetyl-CoA- carboxylase ligase	+	MLSVKAVLARSGVKPLSGPFVKPIQARF	0.8497	84,60%
	Short-chain dehydrogenase/reductase	+	METSTAFYWGFAIVFLLLLRRLMKRKVIDLRG QKVLITGAASGIGRMLAQDMVKK	0.9745	99,00%
		+	MESLVGKVACITGASRGIGRGIALALAKE	0.7621	84,60%
		+	MRREFKHVRNFISNIINIILLWILQYVWTLPG FVVILSYLYSNNTFRA	0.8547	99,00%
	Iron-containing alcohol dehydrogenase	+	MMKAVNNFNFANTTRIVFGKGQIAQLPTLIPK DRIVYMTYGGGSIKRN	0.827	99,00%
	Myb-like DNA-binding protein	+	MKRRQSQSSYPVPVQTKLLRQ	0.7796	99,00%
	Transcriptional coactivator p15	+	MQQRICSICCRISRSPVWKRSEFAWISEPR	0.979	99,00%
	Translation elongation factor EFG/EF2	+	MAAKAVAATSAFSRCFAAPVSDD	0.7195	84,60%
	RNA binding protein	+	MPQSRLVSASSRSRSRSRS	0.9764	84,60%
		+	MGRNSRSRSDSHRSSRSHRHS	0.8585	84,60%
	RAB GTPase activating protein 1	+	MNMLKDWKRFCAANNPKVVKRRIRKGIPLSLRG	0.99	84,60%
		+	MKSLRTLAWNGIPSVYRAVTWKKLLGYLPSIR SRQ	0.9773	84,60%
	Holliday junction resolvase YqgF	+	MAVLTVKQLQSLYSKVAHIRPRLGLDVGTT	0.628	99,00%
	Translation elongation factor EFTu/EF1A	+	MLSALRCVKNLATPAVNKLIVGSRVLPFTSV RSVSYERK	0.9588	99,00%
	ATP-dependent DNA helicase	+	MHRWREIPLFPNPRGYRQRRHRGFLPASLSTT RPNRVADPPSARRSVRLSVRRLPENNAHP	0.8923	84,60%
	Isyl-like splicing	+	MARTQEKAHTLMNKWVTSVHRMRMGQTahrPL SAYECKT	0.9565	99,00%

Translation initiation factor 3 (EIF-3)	+	MGNQLIKTTRRS	0.9879	92,30%
DNA repair protein (XPGC)	+	MIKLLRRFSIQPIFV	0.7237	84,60%
Translation initiation factor 4E (eIF-4E)	+	MSRGRLVIRK	0.59	92,30%
Cold-shock protein DNA-binding	+	MFGLVKSVTSVVPRT	0.935	99,00%
Translation elongation factor EF1A	+	MLHSTLSSQPTKYFFTFRRS	0.7674	99,00%
Translation elongation factor EF1B	+	MLARVISAPLLRSISIRPFATVTAAMVKQLRD LTGAPMMD	0.9727	99,00%
ATP-dependent RNA helicase DBP4	+	MAGKKRQFSQKGKNFGKNKKNRSIGHKKESK	0.9018	92,30%
Twinkle helicase	+	MHVLSQATLQQTRQSLQALHQQGHRRVHLPSL RHLRLLVRFQAEAGGSARGLALLPLSL	0.9662	92,30%
Recombinase A protein (RecA)	+	MLRLTLKRVTGACVRSSILSTGMLQKRWFAAI GKKA	0.9906	99,00%
Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase	+	MRISHRPLTAVLPMM	0.7565	92,30%
Cobalamin adenosyltransferase	+	MLSRVLTRTVKAVPTMTRNLHFRK	0.9971	99,00%
Cwf15/Cwc15 cell cycle control protein	+	MSTAHKPTWTPAAGRG	0.9396	99,00%
	+	MSTAHKPTWTPAAGRG	0.9396	99,00%
Galactokinase	+	MGGYVLFPFPTVLRGVAAGRRVPGKHCRVY	0.6541	84,60%
Phosphoglycerate kinase	+	MLSALSKRLFSTSRTVS	0.9785	99,00%
Serine-threonine kinase	+	MASFIGTPIVNSSYPQRHQSRQHPNRQKQQHQ NRRLRHLRSLHLPIPRPSRRIRYLPRLSTP GSPY	0.9914	92,30%
	+	MNVLALGLPKCSRLNRGVKCRY	0.8909	99,00%
	+	MCRSVGKYRKIARLNEGS	0.6116	99,00%
Dihydropteroate synthase	+	MQVFLALGSNIGNRQKHLYTALSCLRRIASLK DTS	0.9059	84,60%
TyrA protein	+	MLSIAKRVLRVALARPFSVEAQKV	0.9877	99,00%
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	+	MRYHSLVFALLALARN	0.7766	99,00%
Enolase	+	MLSRVSAISLKSFTRA	0.9829	99,00%
Inorganic pyrophosphatase	+	MLSTKLFRLNTSSIRSAVRLLSTYKGCT	0.9855	99,00%
Glutamate-cysteine ligase	+	MCARLIFTISSVTVSFQMRTWKAPASTYNTSV AREGMRKRRISASNQHT	0.9958	99,00%
Ferric reductase	+	MIVASIPAIRRASWELFFYLHQIVILCLLVLF IYHSSNFVYYATIPFVLYAADKLLRWFSIYSK RC	0.8903	84,60%
Pseudouridine synthase	+	MLPPNAAALSMRIAKRIARSGVCSRR	0.9988	92,30%
Lipoyltransferase	+	MSGLIKTINRV	0.9098	92,30%
Rhodanese-like protein	+	MRKYNPRSRNLIIGMLASFRSIALKSTRLNFA RA	0.973	99,00%
	+	MLGTTIYRRDRLRLRLIVIALAF	0.7234	92,30%
CaaX prenyl protease	+	MRSLLRSALWSSHTYTSNWCAFPGRFIPSSSL KKSRAIAFFTRRH	0.9876	99,00%
Arginine/ornithine transport system ATPase	+	MFSCLGRLSRAIPRCHAAAGCSIRLFGTQYS VE	0.9962	99,00%
Fibrillarin	+	MYLTVQTLSHDGSRGGRGGFSGSRGGRGSRGG GRGGARGGGRGARGGGARGGGARGGMR G	0.9842	99,00%
Kinesin	+	MSVTTSTVASSIPVRVVVRV	0.8358	99,00%
	+	MERLLQKAFAIRA	0.7932	92,30%

Cell division cycle protein 48	+	MVQARLSTYFFQEVRRHVLTPSGCIIIGIVAQ SQFGSINRQILCSGYLS	0.9277	84,60%
Protein phosphatase 2C	+	MNASSFFVKSRRALGTVSSLYRTGSIRIGTRG	0.9759	99,00%
C2 calcium-dependent membrane targeting	+	MIHSIHSFNRLILRFIQFIHSFILRFIHSFIF LRFLRLLGFLLLLL	0.9899	99,00%
Cation efflux protein	+	MLSVLHRTTMTPLKLFGLSQGRTVVLGLITPI SNVRPLSFNTPAQ	0.8195	99,00%
Glucose-inhibited division protein A	+	MLSRSICNRYIPFPSSHFRACRSLARQFSST LHYD	0.9884	99,00%
Gtr1/RagA G protein	+	MLSLRRWIGRSTSKPWRSTCTAPTSTSWSF TRWTRS	0.9973	99,00%
Exonuclease RRP6	+	MVEWNVSGGFSVSPFSSRRQRIGSPRKPLSLR NRPFVCGSVFTRSRLGLPRLGVARPRYHRE	0.9082	92,30%
Cullin-4B	+	MDTFWSTILRCIITVSSLLTHLSRGDQKNLT TYCLNQIRSLLSQESSLHIISRVIFFAFFSL QTNIAILKSVKQVRE	0.8047	84,60%
Tetracycline resistance protein	+	MLTTAGNRNRSFHLVVSIACTGFSIILPLV PFVNEVLNTTSLQYSLTFSGYLSMILSSIIF GALSDRIGRRMAIVVSLFGLTLGSVVCYTTSN VYVFIAARV	0.9794	99,00%
Mg <sup>2+</sup> transporter protein	+	MPHSNPLRSLQKGLVQRS	0.7184	92,30%
Major facilitator superfamily MFS-1	+	MLAGQTICGYVSSHFGWRSYFRVIPFLGMISF FIQLPSRG	0.5834	99,00%
Acetyl-CoA synthetase	+	MLSRFSVLKTRNVVRALSTSLKSY	0.9945	99,00%
Holliday junction ATP-dependent DNA helicase ruvB	+	MFKKLHRVKICTQHLSVLVIHCKTSLFAITLV FIIPAEHFLFLIPFSVNKNEGLTGKQKSRRIV AHSHIK	0.5893	92,30%
AFG1-like ATPase	+	MISSISKLVRFQNLRSRAVKAISCHTAVSSIH APLRRFSSTAQPR	0.9899	99,00%
Lipid transporter	+	MQDSVLNRIARSAGLNMVIOVLNRLFSFLINA ILIRF	0.8188	84,60%
Metallophosphoesterase	+	MKIVRTIYLRGFSKSILWT	0.8816	92,30%
Mitochondrial glycoprotein family protein (MAM33)	+	MLSKLLSNVSALRVGMRPLARSFATRFYDS	0.9875	92,30%
Peptidase S54	+	MSKRSVSVLQPVITTSKRVVYDNYRMFSRRPL QFSDSAY	0.859	84,60%
Elongation factor Tu	+	MLSALRCVKNLATPAVNKLIVGSRVLPFTSV RSVSYERK	0.9588	99,00%
tRNA pseudouridine synthase D	+	MKSTRIKSRPHTLIRKYLRQKWLRLTKTEV NHQNVCSMYIISRL	0.8689	84,60%
Glycosyl transferase	+	MRSNSNFKSPKNKNSTSPRL	0.6401	99,00%
GTP binding protein	+	MFCLFGRTGAKSFRLARCIRPIHSGRGISRLG CFPCSSVVWDRVTAYSSFLSTATQRRFIGSNH EQY	0.9993	99,00%
Tetraacyldisaccharide-1-P 4 kinase	+	MSLLLRKAACATRTLARGLFGF	0.9928	99,00%
Glutamine cyclotransferase	+	MSIIIVRALRN	0.5644	92,30%
Ribosomal RNA methyltransferase	+	MFPTILRNSCYNGWRHTILRQFTTFKTAF	0.9466	99,00%
N-acetylglucosaminyltransferase I	+	MLFHRLLLKVLRLPALNRV	0.9893	92,30%
Phospholipid/glycerol acyltransferase	+	MRPIFGSNKIR	0.8955	92,30%
Tetratricopeptide TPR_2	+	MHILQRKGNRRFHDVPKMVTQLNSWFKGRL	0.9633	99,00%
Iron-containing alcohol dehydrogenase	+	MMKAVNNFNFANTTRIVFGKGQIAQLPTLIPK DRIVYMTYGGGSIKRN	0.8154	99,00%

	+	MKAVNNFNFANTTRIVFGKGQIAQLPTLIPKD RIVYMTYGGGSIKRN	0.5345	99,00%
Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase	+	MSLSCARSTHRGLLRGLLVARS	0.9878	92,30%
Carbohydrate kinase	+	MSSLQILKIARGIIPPLTSSLHKGQLGKIGVI GGCLEYTGAPFYAGISAMRA	0.8475	99,00%
ATP-NAD kinase	+	MGKTFQARRLTRHYSAYSVDPLFPPVAIRSL KSCVSE	0.8779	84,60%
Adenylate kinase	+	MSLLRSSLILGRSLQSSVRCFSSTAGNV	0.9854	92,30%
Riboflavin kinase	+	MSVVRCTKLPVCRIEGTVVHGFKRG	0.6833	99,00%
Protein kinase	+	MNLRQPLQRRVTQYSVIRA	0.8998	92,30%
Methyltransferase	+	MFVLRSLSQKTAPFAVNLKTMRLRT	0.9743	99,00%
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	+	MSLNLKLVGSWRTSRHLTNATQKSLSGILAR SYMAGRNNVAAQGLQMKNNAAELPSSAPFIYP TRKGRC	0.9881	92,30%
Hypothetical protein	+	MLCGARKPKMCARSIVSNLVPRIKLGACNRS	0.9707	92,30%
Unknown protein	+	MGNSVQTRNRRMFGNLLGHL	0.9519	99,00%
Unknown protein	+	MSKFTALSVALAIITRGIPSNLTKS	0.9228	99,00%
Unknown protein	+	MLAIRRGYRIVSPLRRFFAEI PAVN	0.9981	99,00%
Hypothetical protein	+	MTKKTKTRY	0.7304	84,60%
Hypothetical protein	+	MSIALRNRIAISSARRVALYRTVRCFATQSE SA	0.9976	92,30%
	+	MSIALRNRIAISSARRVALYRTVRCFATQSE SA	0.9976	92,30%
Hypothetical protein	+	MLKVAKNLRFGFFTNGYSSRRLISLNQIRPFT VSTTEQ	0.9507	84,60%
Unknown protein	+	MQRLLSPTARLTARCFRRFAGAEAKA	0.9946	99,00%
Unknown protein	+	MLSTLSRVKIPSRQIVCVSRLITHGSDVY	0.6747	99,00%
Unknown protein	+	MSSRSFTQSASLSSSQSIGSNSRPFMNSFPG S	0.7093	92,30%
Hypothetical protein	+	MSIALRNRIAISSARRVALYRTVRCFATQSE SA	0.9976	92,30%
Hypothetical protein	+	MQARFRGLTNLVHYAKYVVCPRVGLRVFSTE SPS	0.9792	99,00%
Hypothetical protein	+	MLARVLQNPLSSRLIVTRSVSAFFQRRAFSEN AESV	0.9823	99,00%
Hypothetical protein	+	MLSSLRTIRSLPARRVFVSCFSTL	0.9687	99,00%
Unknown protein	+	MKRHRFRHRNVALALRNVLRLTKTSRRKLSEEL RDL	0.9932	99,00%
Hypothetical protein	+	MYALKLAKCLLRPAQFAPVRSTLRAFTNPKG M	0.9741	99,00%
Hypothetical protein	+	MRLNGRSRSRSRSSSSCRHRSRS	0.9722	92,30%
Hypothetical protein	+	MISLFVRNGARALSAVRAVG	0.9277	99,00%
Hypothetical protein	+	MLVSAKGLGTLRFVGRPCFFAKALNSSLGSAR LFSQVRDPF	0.9442	92,30%
Hypothetical protein	+	MQSQDYLLNGRLVNNMVKMLFTRC	0.6696	84,60%
Hypothetical protein	+	MTLPSSLGRGFPSFVFFVAKIGAILLLAFHGML AFMLNIAFNNAVKEGGPLMMNVGNVKQVVM ILSVVLFNNKMKPIGVIGSVICITGSMWYS MRI	0.7913	84,60%
Unknown protein	+	MCCQNAIQRTTVKVANLRG	0.7002	84,60%
Hypothetical protein	+	MKRLESTRRI	0.9218	92,30%
Hypothetical protein	+	MSRINRMNRMKAMKAMKAMKAMKAMNRVK RMKEMNRTKRVNRMKAMKAMNRVKRMT PMTPTMPMTNRTKRVNRM	0.9997	99,00%
Unknown protein	+	MIIFNTKRLFSVTDST	0.9658	84,60%

Hypothetical protein	+	MCGTCWRVGSRLPTRWSASRAKWAVPSGWAG NSECPRWPRR	0.9793	92,30%
Hypothetical protein	+	MISLVNRGITRTFLDSTVRSFSVVGST	0.9944	99,00%
Hypothetical protein	+	MLASSVFRVSRGVSVVVRTAARCRGGFSSPSL RFVLPPNTASICVRAFATSQEGE	0.9987	99,00%
Unknown protein	+	MKKLFEAISRWY	0.8129	99,00%
Hypothetical protein	+	MSFLAKVSPIHLLRRAFTRVINIE	0.9705	92,30%
Unknown protein	+	MTTTRSRGSDATSRRSRRRTRWRSSWIRGMMC RSRSKRRRRRRRRKKERKKRRRTSRAGR R	1,0000	99,00%
Unknown protein	+	MELLCSLTSSVCRAFYGIAGYTGRRIAPALS RLGTSSICARTIGTSSPNN	0.9413	92,30%
Hypothetical protein	+	MGRRPARCYRYCKNKPYIKSRFCRG	0.9407	92,30%
Hypothetical protein	+	MFVLRSLSQKTAPLAVNGLKTMLRRT	0.9684	99,00%
Hypothetical protein	+	MASRDLIMTFFGTGAMKPSLRG	0.6831	84,60%
Unknown protein	+	MSPVLRNQRTLQARRKMRRKLAENGKKSVAS AKRPRLLLKLLLPKKRQNRKRRKRFARSGRKS ERSGRRLKQLPPQLPRLLLLLKKRQNRKKRK LVENGKKS	1,0000	99,00%
Unknown protein	+	MVKLFRTRLRYRFTYLPPTVKSRV	0.935	92,30%
Unknown protein	+	MKKRKTKMNHKWKRSKAKRF	0.9084	99,00%
Unknown protein	+	MSARVFSRIPRQFARGVRFQRMAMPQVNPKMW STNGMNFREFANELNSQYMKSSRTLRLQLATMR VM	0.9989	99,00%
Unknown protein	+	MSARVFSSIPKQFARAARLRFANSPQMSRRMW KQAEQTMSFLKQINKPVVPKSRSFSEMMERF	0.9987	99,00%
Unknown protein	+	MLSRALAFRTTFRGIYGMGANLQVFSRT	0.9913	99,00%
Unknown protein	+	MFNAIKQSAQKSVITVTSWYRV	0.9022	99,00%
Hypothetical protein	+	MFVLRSLSQKTAPFAVNGLKTMLRRT	0.9743	99,00%
Unknown protein	+	MNLAATYSPKYIGVCRKAPVALKTRG	0.5987	99,00%
Hypothetical protein	+	MGRHSRSRSRSHSRSR	0.7062	92,30%
Unknown protein	+	MYVVRKRISQPRNWTIAWQTMTRFWSWNRRSR STRANAGNWS	0.9671	92,30%
Unknown protein	+	MRSDIRSLPSGPGSAKVAPAGSAGLAQGVVA GMPQLVSPAVIPAVNRPLGQGYVPGVAALMPF MQPAYFAQQGGPLPAGMAPTARF	0.6728	92,30%
Hypothetical protein	+	MFRLAVPRLVQLARPAVTVPRLTPLCRDFSN RRRAG	0.8791	92,30%
Unknown protein	+	MVNRLQRQIQAIHRE	0.7851	84,60%
Unknown protein	+	MYAIRRGYRIVSPLRRFFAEIPAVN	0.9876	99,00%
Hypothetical protein	+	MFRTLGTAAARFPCLASSRGVVRNRFALVNDI SVRKRLTIGLSGFAIVATGCFYTGRTIYRSRR AKKMARL	0.996	92,30%
Unknown protein	+	MKTLAQRSLAAVRKVN	0.8994	84,60%
Unknown protein	+	MMKNLRILVAPNQPS	0.5337	92,30%
Hypothetical protein	+	MRLGQTICRREFASSGSTWNFPSTLAFFALS S	0.866	99,00%
Unknown protein	+	MPHRSPQRRANQLRRSQPDSRSLSPLRYP NSTFLRSGHPSSRLRPPHPRQEAPPRGNPR VRRHPGRS	0.946	84,60%
Unknown protein	+	MVWSVLLPRSPIRSSVCRA	0.9829	92,30%
Hypothetical protein	+	MDKSLPVAPKKYRFGICAMRK	0.5831	84,60%
Unknown protein	+	MLFRLLLVYSVAVKTHRSRLPAFSSQQILAMLS DYVLFHVFPGLTAVPAKKVVEMAQQRKGAK SRG	0.8091	99,00%

Hypothetical protein	+	MSSTYYTLFQFKIKWKRRRT	0.6008	99,00%
Hypothetical protein	+	MSAAIFIRYCSREMNPVWRRAFSSVLSYSRY PLFVVVRKGYSSRLFRRNSSFFRK	0.9974	92,30%
Hypothetical protein	+	MWLKTWRKRFFILKGNKLYFSKGTRE	0.8502	92,30%
Unnamed protein product	+	MIKQKFNPTHQRPVFKRMLAFRGRALFSRLQT ICRGGNNPSFLSCCNLPGRSLLGNGLNARF	0.9849	99,00%
Hypothetical protein	+	MLAAVCRRAGAPLVRRFDSLSLRNVSFALYGV KKSGKVFQTD CFGGTMQVRRFASASEPM	0.9817	92,30%
Hypothetical protein	+	MSPIQPNQSGSLPFARSTQSASQLQQSKGLTN SLSNSSLRRS	0.9862	84,60%
Hypothetical protein	+	MLKAYRYILSSKMTK	0.9529	84,60%
Hypothetical protein	+	MFRTGLVRSLFAVARVASKPATVVRCFSPLVT PTNSQLLRTVRSNAPLFRSFATGNLTS	0.999	92,30%
Hypothetical protein	+	MGSGAKTKGKRQAGAGHRYTRRM	0.9898	92,30%
Hypothetical protein	+	MTKKTTRRY	0.7304	84,60%
Hypothetical protein	+	MNRVFGILAILA	0.6393	92,30%
Hypothetical protein	+	MFRNALRATCRVLRQSEEV	0.9686	84,60%
Hypothetical protein	+	MKRRARRRRWKRRQ	0.9939	84,60%
Unknown protein	+	MLSFQRVLPGIGNGIVAYSRVAVRCY	0.8213	99,00%



# **Chapitre V**

## **Références bibliographiques**





- Abe, N., Wu, Z., and Yoshikawa, H. (2003a) Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from birds by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitol Res* **89**: 393-396.
- Abe, N., Wu, Z., and Yoshikawa, H. (2003b) Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from primates. *Vet Parasitol* **113**: 321-325.
- Abe, N., Wu, Z., and Yoshikawa, H. (2003c) Zoonotic genotypes of *Blastocystis hominis* detected in cattle and pigs by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitol Res* **90**: 124-128.
- Abe, N. (2004a) Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Vet. Parasitol.* **120**: 235-242.
- Abe, N. (2004b) Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Vet Parasitol* **120**: 235-242.
- Adams, K.L., and Palmer, J.D. (2003) Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol* **29**: 380-395.
- Aguiar, J.I., Goncalves, A.Q., Sodre, F.C., Pereira Sdos, R., Boia, M.N., de Lemos, E.R., and Daher, R.R. (2007) Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. *Rev Soc Bras Med Trop* **40**: 631-634.
- Akhmanova, A., Voncken, F., van Alen, T., van Hoek, A., Boxma, B., Vogels, G., Veenhuis, M., and Hackstein, J.H. (1998) A hydrogenosome with a genome. *Nature* **396**: 527-528.
- Akhmanova, A., Voncken, F.G., Hosea, K.M., Harhangi, H., Keltjens, J.T., op den Camp, H.J., Vogels, G.D., and Hackstein, J.H. (1999) A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Mol Microbiol* **32**: 1103-1114.
- Alderete, J.F., and Garza, G.E. (1985) Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. *Infect Immun* **50**: 701-708.
- Alderete, J.F., and Garza, G.E. (1988) Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. *Infect Immun* **56**: 28-33.
- Alderete, J.F., O'Brien, J.L., Arroyo, R., Engbring, J.A., Musatovova, O., Lopez, O., Lauriano, C., and Nguyen, J. (1995) Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol Microbiol* **17**: 69-83.
- Alderete, J.F., Engbring, J., Lauriano, C.M., and O'Brien, J.L. (1998) Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. *Microb Pathog* **24**: 1-16.
- Alderete, J.F., Millsap, K.W., Lecker, M.W., and Benchimol, M. (2001) Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cell Microbiol* **3**: 359-370.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Andersson, J.O., and Roger, A.J. (2002) A cyanobacterial gene in nonphotosynthetic protists--an early chloroplast acquisition in eukaryotes? *Curr Biol* **12**: 115-119.



- Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., and Kurland, C.G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**: 133-140.
- ANOFEL (2010) Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006-2009. *Euro Surveill* **15**: 19642.
- Aoki-Kinoshita, K.F., and Kanehisa, M. (2007) Gene annotation and pathway mapping in KEGG. *Methods Mol Biol* **396**: 71-91.
- Arisue, N., Hashimoto, T., Yoshikawa, H., Nakamura, Y., Nakamura, G., Nakamura, F., Yano, T.A., and Hasegawa, M. (2002) Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *J Eukaryot Microbiol* **49**: 42-53.
- Arisue, N., Hashimoto, T., and Yoshikawa, H. (2003) Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *blastocystis* isolates. *Parasitology* **126**: 1-9.
- Arroyo, R., Engbring, J., and Alderete, J.F. (1992) Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* **6**: 853-862.
- Banaticla, J.E., and Rivera, W.L. (2011) Detection and subtype identification of *Blastocystis* isolates from wastewater samples in the Philippines. *J Water Health* **9**: 128-137.
- Barbera, M.J., Ruiz-Trillo, I., Tufts, J.Y., Bery, A., Silberman, J.D., and Roger, A.J. (2010) *Sawyeria marylandensis* (Heterolobosea) Has a Hydrogenosome with Novel Metabolic Properties. *Eukaryot Cell* **9**: 1913-1924.
- Benard, G., and Rossignol, R. (2008) Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal* **10**: 1313-1342.
- Benchimol, M., Elias, C.A., and De Souza, W. (1982) *Tritrichomonas foetus*: ultrastructural localization of calcium in the plasma membrane and in the hydrogenosome. *Exp Parasitol* **54**: 277-284.
- Benchimol, M., and De Souza, W. (1983) Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. *J Protozool* **30**: 422-425.
- Benchimol, M., Almeida, J.C., and de Souza, W. (1996) Further studies on the organization of the hydrogenosome in *Tritrichomonas foetus*. *Tissue Cell* **28**: 287-299.
- Benchimol, M., Durand, R., and Almeida, J.C. (1997) A double membrane surrounds the hydrogenosomes of the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiol Lett* **154**: 277-282.
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J.P., Sloof, P., Van Boom, J.H., and Tromp, M.C. (1986) Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* **46**: 819-826.
- Berger, J., and Lynn, D.H. (1992) Hydrogenosome-methanogen assemblages in the echinoid endocommensal plagiopylid ciliates *Lechriopyla mystax* Lynch, 1930, and *Plagiopyla minuta* Powers, 1933. *J. Protozool.* **39**: 4-8.
- Berriman, M., and Ghedin, E., and Hertz-Fowler, C., and Blandin, G., and Renauld, H., and Bartholomeu, D.C., and Lennard, N.J., and Caler, E., and Hamlin, N.E., and Haas, B., and Bohme, U., and Hannick, L., and Aslett, M.A., and Shallom, J., and Marcello, L., and Hou, L., and Wickstead, B., and Alsmark, U.C., and Arrowsmith, C., and Atkin, R.J., and Barron, A.J., and Bringaud, F., and Brooks, K., and Carrington, M., and Cherevach, I., and Chillingworth, T.J., and Churcher, C., and Clark, L.N., and Corton,



- C.H., and Cronin, A., and Davies, R.M., and Doggett, J., and Djikeng, A., and Feldblyum, T., and Field, M.C., and Fraser, A., and Goodhead, I., and Hance, Z., and Harper, D., and Harris, B.R., and Hauser, H., and Hostetler, J., and Ivens, A., and Jagels, K., and Johnson, D., and Johnson, J., and Jones, K., and Kerhornou, A.X., and Koo, H., and Larke, N., and Landfear, S., and Larkin, C., and Leech, V., and Line, A., and Lord, A., and Macleod, A., and Mooney, P.J., and Moule, S., and Martin, D.M., and Morgan, G.W., and Mungall, K., and Norbertczak, H., and Ormond, D., and Pai, G., and Peacock, C.S., and Peterson, J., and Quail, M.A., and Rabinowitsch, E., and Rajandream, M.A., and Reitter, C., and Salzberg, S.L., and Sanders, M., and Schobel, S., and Sharp, S., and Simmonds, M., and Simpson, A.J., and Tallon, L., and Turner, C.M., and Tait, A., and Tivey, A.R., and Van Aken, S., and Walker, D., and Wanless, D., and Wang, S., and White, B., and White, O., and Whitehead, S., and Woodward, J., and Wortman, J., and Adams, M.D., and Embley, T.M., and Gull, K., and Ullu, E., and Barry, J.D., and Fairlamb, A.H., and Opperdoes, F., and Barrell, B.G., and Donelson, J.E., and Hall, N., and Fraser, C.M., and Melville, S.E., and El-Sayed, N.M. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**: 416-422.
- Blaxter, M., Daub, J., Guiliano, D., Parkinson, J., and Whitton, C. (2002) The *Brugia malayi* genome project: expressed sequence tags and gene discovery. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **96**: 7-17.
- Boeck, W.C., and Drbohlav, J. (1925) The Cultivation of *Entamoeba Histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **11**: 235-238.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2008) Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* **9**: 42-49.
- Boorom, K.F., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Spanakos, G., Parkar, U., Li, L.H., Zhou, X.N., Ok, U.Z., Leelayoova, S., and Jones, M.S. (2008) Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, Blastocystis, and asymptomatic infection. *Parasit Vectors* **1**: 40.
- Boreham, P.F., Upcroft, J.A., and Dunn, L.A. (1992) Protein and DNA evidence for two demes of *Blastocystis hominis* from humans. *Int J Parasitol* **22**: 49-53.
- Boreham, P.F., and Stenzel, D.J. (1993a) The current status of *blastocystis hominis*. *Parasitol Today* **9**: 251.
- Boreham, P.F., and Stenzel, D.J. (1993b) *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv Parasitol* **32**: 1-70.
- Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otilar, R.P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., Verret, F., Berges, J.A., Brownlee, C., Cadoret, J.P., Chiovitti, A., Choi, C.J., Coesel, S., De Martino, A., Detter, J.C., Durkin, C., Falciatore, A., Fournet, J., Haruta, M., Huysman, M.J., Jenkins, B.D., Jiroutova, K., Jorgensen, R.E., Joubert, Y., Kaplan, A., Kroger, N., Kroth, P.G., La Roche, J., Lindquist, E., Lommer, M., Martin-Jezequel, V., Lopez, P.J., Lucas, S., Mangogna, M., McGinnis, K., Medlin, L.K., Montsant, A., Oudot-Le Secq, M.P., Napoli, C., Obornik, M., Parker, M.S., Petit, J.L., Porcel, B.M., Poulsen, N., Robison, M., Rychlewski, L., Rynearson, T.A., Schmutz, J., Shapiro, H., Siaut, M., Stanley, M., Sussman, M.R., Taylor, A.R., Vardi, A., von Dassow, P., Vyverman, W., Willis, A., Wyrwicz, L.S., Rokhsar, D.S., Weissenbach, J., Armbrust, E.V., Green, B.R., Van de Peer, Y., and Grigoriev, I.V. (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* **456**: 239-244.
- Boxma, B., Voncken, F., Jannink, S., van Alen, T., Akhmanova, A., van Weelden, S.W., van Hellemond, J.J., Ricard, G., Huynen, M., Tielens, A.G., and Hackstein, J.H. (2004) The anaerobic chytridiomycete fungus *Piromyces* sp. E2 produces ethanol via



- pyruvate:formate lyase and an alcohol dehydrogenase E. *Mol Microbiol* **51**: 1389-1399.
- Boxma, B., de Graaf, R.M., van der Staay, G.W., van Alen, T.A., Ricard, G., Gabaldon, T., van Hoek, A.H., Moon-van der Staay, S.Y., Koopman, W.J., van Hellemond, J.J., Tielens, A.G., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M.A., and Hackstein, J.H. (2005) An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* **434**: 74-79.
- Bozner, P. (1997) Immunological detection and subcellular localization of Hsp70 and Hsp60 homologs in *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol* **83**: 224-229.
- Bringaud, F., Riviere, L., and Coustou, V. (2006) Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* **149**: 1-9.
- Brittan, F. (1849) Report of a series of microscopical investigations on the pathology of cholera. *London Med. Gaz.* **9**: 530-542.
- Bruchhaus, I., Loftus, B.J., Hall, N., and Tannich, E. (2003) The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell* **2**: 501-509.
- Brumpt, E. (1912) *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **5**: 725-730.
- Brunk, C.F., Lee, L.C., Tran, A.B., and Li, J. (2003) Complete sequence of the mitochondrial genome of *Tetrahymena thermophila* and comparative methods for identifying highly divergent genes. *Nucleic Acids Res* **31**: 1673-1682.
- Bui, E.T., Bradley, P.J., and Johnson, P.J. (1996) A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9651-9656.
- Burri, L., Williams, B.A., Bursac, D., Lithgow, T., and Keeling, P.J. (2006) Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 15916-15920.
- Carbajal, J.A., del Castillo, L., Lanuza, M.D., Villar, J., and Borrás, R. (1997) Karyotypic diversity among *Blastocystis hominis* isolates. *Int J Parasitol* **27**: 941-945.
- Carlton, J.M., Angiuoli, S.V., Suh, B.B., Kooij, T.W., Perte, M., Silva, J.C., Ermolaeva, M.D., Allen, J.E., Selengut, J.D., Koo, H.L., Peterson, J.D., Pop, M., Kosack, D.S., Shumway, M.F., Bidwell, S.L., Shallom, S.J., van Aken, S.E., Riedmuller, S.B., Feldblyum, T.V., Cho, J.K., Quackenbush, J., Sedegah, M., Shoaibi, A., Cummings, L.M., Florens, L., Yates, J.R., Raine, J.D., Sinden, R.E., Harris, M.A., Cunningham, D.A., Preiser, P.R., Bergman, L.W., Vaidya, A.B., van Lin, L.H., Janse, C.J., Waters, A.P., Smith, H.O., White, O.R., Salzberg, S.L., Venter, J.C., Fraser, C.M., Hoffman, S.L., Gardner, M.J., and Carucci, D.J. (2002) Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature* **419**: 512-519.
- Carlton, J.M. (2003) Genome sequencing and comparative genomics of tropical disease pathogens. *Cell Microbiol* **5**: 861-873.
- Carlton, J.M., Hirt, R.P., Silva, J.C., Delcher, A.L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J.R., Bidwell, S.L., Alsmark, U.C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C.J., Dacks, J.B., Foster, P.G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., Westrop, G.D., Muller, S., Dessi, D., Fiori, P.L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F.D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M.T., Hayes, R.D., Mukherjee, M., Okumura, C.Y., Schneider, R., Smith, A.J., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B.J., Perte, M., Feldblyum, T.V., Utterback, T.R., Shu, C.L., Osoegawa, K., de Jong, P.J., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, S.B., Logsdon, J.M., Jr., Henze, K., Gupta, A., Wang, C.C., Dunne, R.L., Upcroft, J.A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S.L., Tang, P., Chiu, C.H., Lee, Y.S., Embley, T.M., Coombs, G.H., Mottram,





- J.C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C.M., and Johnson, P.J. (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* **315**: 207-212.
- Carruthers, V.B., and Cross, G.A. (1992) High-efficiency clonal growth of bloodstream- and insect-form *Trypanosoma brucei* on agarose plates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 8818-8821.
- Cassano, N., Scoppio, B.M., Loviglio, M.C., and Vena, G.A. (2005) Remission of delayed pressure urticaria after eradication of *Blastocystis hominis*. *Acta Derm Venereol* **85**: 357-358.
- Cassidy, M.F., Stenzel, D.J., and Boreham, P.F. (1994) Electron microscopy of surface structures of *Blastocystis* sp. from different hosts. *Parasitol Res* **80**: 505-511.
- Castillo, E., Dea-Ayuela, M.A., Bolas-Fernandez, F., Rangel, M., and Gonzalez-Rosende, M.E. (2010) The kinetoplastid chemotherapy revisited: current drugs, recent advances and future perspectives. *Curr Med Chem* **17**: 4027-4051.
- Cavalier-Smith, T. (1987) Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* **326**: 332-333.
- Cerkasovova, A., Lukasova, G., Cerkasov, J., and Kulda, J. (1973) Biochemical characterization of large granule fraction of *Tritrichomonas foetus* (strain KV1). *J. Protozool.* **20**: 525.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**: 628-644.
- Chandramathi, S., Suresh, K., and Kuppusamy, U.R. (2010a) Solubilized antigen of *Blastocystis hominis* facilitates the growth of human colorectal cancer cells, HCT116. *Parasitol Res* **106**: 941-945.
- Chandramathi, S., Suresh, K., Shuba, S., Mahmood, A., and Kuppusamy, U.R. (2010b) High levels of oxidative stress in rats infected with *Blastocystis hominis*. *Parasitology* **137**: 605-611.
- Chandramathi, S., Suresh, K.G., Mahmood, A.A., and Kuppusamy, U.R. (2010c) Urinary hyaluronidase activity in rats infected with *Blastocystis hominis*--evidence for invasion? *Parasitol Res* **106**: 1459-1463.
- Chen, T.L., Chan, C.C., Chen, H.P., Fung, C.P., Lin, C.P., Chan, W.L., and Liu, C.Y. (2003) Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis hominis* in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg* **69**: 213-216.
- Chen, X.Q., Singh, M., Ho, L.C., Tan, S.W., Ng, G.C., Moe, K.T., and Yap, E.H. (1997) Description of a *Blastocystis* species from *Rattus norvegicus*. *Parasitol Res* **83**: 313-318.
- Chen, X.Q., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., and Yap, E.H. (1999) In vitro encystation and excystation of *Blastocystis ratti*. *Parasitology* **118** ( Pt 2): 151-160.
- Cimerman, S., Ladeira, M.C., and Iuliano, W.A. (2003) [Blastocystosis: nitazoxanide as a new therapeutic option]. *Rev Soc Bras Med Trop* **36**: 415-417.
- Cirioni, O., Giacometti, A., Drenaggi, D., Ancarani, F., and Scalise, G. (1999) Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. *Eur J Epidemiol* **15**: 389-393.
- Clark, C.G. (1997) Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **87**: 79-83.



- Claros, M.G., and Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**: 779-786.
- Clifton, S.W., Minx, P., Fauron, C.M., Gibson, M., Allen, J.O., Sun, H., Thompson, M., Barbazuk, W.B., Kanuganti, S., Tayloe, C., Meyer, L., Wilson, R.K., and Newton, K.J. (2004) Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant Physiol* **136**: 3486-3503.
- Corrales, R.M., Sereno, D., and Mathieu-Daude, F. (2010) Deciphering the Leishmania exoproteome: what we know and what we can learn. *FEMS Immunol Med Microbiol* **58**: 27-38.
- Coustou, V., Besteiro, S., Riviere, L., Biran, M., Biteau, N., Franconi, J.M., Boshart, M., Baltz, T., and Bringaud, F. (2005) A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic Trypanosoma brucei. *J Biol Chem* **280**: 16559-16570.
- Cox, C.J., Foster, P.G., Hirt, R.P., Harris, S.R., and Embley, T.M. (2008) The archaeobacterial origin of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 20356-20361.
- Dacks, J.B., Dyal, P.L., Embley, T.M., and van der Giezen, M. (2006) Hydrogenosomal succinyl-CoA synthetase from the rumen-dwelling fungus Neocallimastix patriciarum; an energy-producing enzyme of mitochondrial origin. *Gene* **373**: 75-82.
- Dagci, H., Ustun, S., Taner, M.S., Ersoz, G., Karacasu, F., and Budak, S. (2002) Protozoon infections and intestinal permeability. *Acta Trop* **81**: 1-5.
- de Graaf, R.M., Ricard, G., van Alen, T.A., Duarte, I., Dutilh, B.E., Burgdorf, C., Kuiper, J.W., van der Staay, G.W., Tielens, A.G., Huynen, M.A., and Hackstein, J.H. (2011) The organellar genome and metabolic potential of the hydrogen- producing mitochondrion of Nyctotherus ovalis. *Mol Biol Evol*.
- De Souza, W., and Benchimol, M. (1988) Electron spectroscopic imaging of calcium in the hydrogenosomes of Tritrichomonas foetus. *J Submicrosc Cytol Pathol* **20**: 619-621.
- de Souza, W., Attias, M., and Rodrigues, J.C. (2009) Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 2069-2080.
- Delgadillo, M.G., Liston, D.R., Niazi, K., and Johnson, P.J. (1997) Transient and selectable transformation of the parasitic protist Trichomonas vaginalis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 4716-4720.
- Dellers, E.A., Dunn, J.C., DeSantis, P., and Aronchick, C.A. (1992) Identification of Blastocystis hominis by colonic brush cytology. A case report. *Acta Cytol* **36**: 757-758.
- Denoeud, F., Roussel, M., Noel, B., Wawrzyniak, I., Da Silva, C., Diogon, M., Viscogliosi, E., Brochier-Armanet, C., Couloux, A., Poulain, J., Segurans, B., Anthouard, V., Texier, C., Blot, N., Poirier, P., Choo, N.G., Tan, K.S., Artiguenave, F., Jaillon, O., Aury, J.M., Delbac, F., Wincker, P., Vivares, C.P., and El Alaoui, H. (2011) Genome sequence of the stramenopile Blastocystis, a human anaerobic parasite. *Genome Biol* **12**: R29.
- Diaz, E., Mondragon, J., Ramirez, E., and Bernal, R. (2003) Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* **68**: 384-385.
- Dogruman-Al, F., Dagci, H., Yoshikawa, H., Kurt, O., and Demirel, M. (2008) A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of Blastocystis hominis. *Parasitol Res* **103**: 685-689.



- Dogruman-Al, F., Kustimur, S., Yoshikawa, H., Tuncer, C., Simsek, Z., Tanyuksel, M., Araz, E., and Boorom, K. (2009) Blastocystis subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**: 724-727.
- Dogruman-Al, F., Simsek, Z., Boorom, K., Ekici, E., Sahin, M., Tuncer, C., Kustimur, S., and Altinbas, A. (2010) Comparison of methods for detection of Blastocystis infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLoS One* **5**: e15484.
- Dominguez-Marquez, M.V., Guna, R., Munoz, C., Gomez-Munoz, M.T., and Borrás, R. (2009) High prevalence of subtype 4 among isolates of Blastocystis hominis from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitol Res* **105**: 949-955.
- Dunn, L.A., Boreham, P.F., and Stenzel, D.J. (1989) Ultrastructural variation of Blastocystis hominis stocks in culture. *Int J Parasitol* **19**: 43-56.
- Dyall, S.D., Koehler, C.M., Delgadillo-Correa, M.G., Bradley, P.J., Plumper, E., Leuenberger, D., Turck, C.W., and Johnson, P.J. (2000) Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Mol Cell Biol* **20**: 2488-2497.
- Dyall, S.D., Yan, W., Delgadillo-Correa, M.G., Lunceford, A., Loo, J.A., Clarke, C.F., and Johnson, P.J. (2004) Non-mitochondrial complex I proteins in a hydrogenosomal oxidoreductase complex. *Nature* **431**: 1103-1107.
- El-Sayed, N.M., Alarcon, C.M., Beck, J.C., Sheffield, V.C., and Donelson, J.E. (1995) cDNA expressed sequence tags of Trypanosoma brucei rhodesiense provide new insights into the biology of the parasite. *Mol Biochem Parasitol* **73**: 75-90.
- El-Sayed, N.M., Hegde, P., Quackenbush, J., Melville, S.E., and Donelson, J.E. (2000) The African trypanosome genome. *Int J Parasitol* **30**: 329-345.
- Elwakil, H.S., and Hewedi, I.H. (2010) Pathogenic potential of Blastocystis hominis in laboratory mice. *Parasitol Res* **107**: 685-689.
- Embley, T.M., van der Giezen, M., Horner, D.S., Dyal, P.L., and Foster, P. (2003) Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**: 191-201; discussion 201-192.
- Embley, T.M., and Martin, W. (2006) Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* **440**: 623-630.
- Engbring, J.A., O'Brien, J.L., and Alderete, J.F. (1996) Trichomonas vaginalis adhesin proteins display molecular mimicry to metabolic enzymes. *Adv Exp Med Biol* **408**: 207-223.
- Engbring, J.A., and Alderete, J.F. (1998) Characterization of Trichomonas vaginalis AP33 adhesin and cell surface interactive domains. *Microbiology* **144** ( Pt 11): 3011-3018.
- Eroglu, F., and Koltas, I.S. (2010) Evaluation of the transmission mode of B. hominis by using PCR method. *Parasitol Res* **107**: 841-845.
- Esser, C., Ahmadinejad, N., Wiegand, C., Rotte, C., Sebastiani, F., Gelius-Dietrich, G., Henze, K., Kretschmann, E., Richly, E., Leister, D., Bryant, D., Steel, M.A., Lockhart, P.J., Penny, D., and Martin, W. (2004) A genome phylogeny for mitochondria among alpha-proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes. *Mol Biol Evol* **21**: 1643-1660.



- Feagin, J.E., Werner, E., Gardner, M.J., Williamson, D.H., and Wilson, R.J. (1992) Homologies between the contiguous and fragmented rRNAs of the two *Plasmodium falciparum* extrachromosomal DNAs are limited to core sequences. *Nucleic Acids Res* **20**: 879-887.
- Foth, B.J., Stimmer, L.M., Handman, E., Crabb, B.S., Hodder, A.N., and McFadden, G.I. (2005) The malaria parasite *Plasmodium falciparum* has only one pyruvate dehydrogenase complex, which is located in the apicoplast. *Mol Microbiol* **55**: 39-53.
- Franco, G.R., Valadao, A.F., Azevedo, V., and Rabelo, E.M. (2000) The *Schistosoma* gene discovery program: state of the art. *Int J Parasitol* **30**: 453-463.
- Frey, T.G., Renken, C.W., and Perkins, G.A. (2002) Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta* **1555**: 196-203.
- Gabaldon, T., and Huynen, M.A. (2003) Reconstruction of the proto-mitochondrial metabolism. *Science* **301**: 609.
- Gabaldon, T., and Huynen, M.A. (2004) Shaping the mitochondrial proteome. *Biochim Biophys Acta* **1659**: 212-220.
- Garcia, A.F., Chang, T.H., Benchimol, M., Klumpp, D.J., Lehker, M.W., and Alderete, J.F. (2003) Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* **47**: 1207-1224.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., and Barrell, B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**: 498-511.
- Gaston, D., Tsaousis, A.D., and Roger, A.J. (2009) Predicting proteomes of mitochondria and related organelles from genomic and expressed sequence tag data. *Methods Enzymol* **457**: 21-47.
- Gericke, A.S., Burchard, G.D., Knobloch, J., and Walderich, B. (1997) Isoenzyme patterns of *Blastocystis hominis* patient isolates derived from symptomatic and healthy carriers. *Trop Med Int Health* **2**: 245-253.
- Germot, A., Philippe, H., and Le Guyader, H. (1996) Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14614-14617.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Fiorentini, A., Fortuna, M., and Scalise, G. (1999) Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**: 436-439.
- Gill, E.E., Diaz-Trivino, S., Barbera, M.J., Silberman, J.D., Stechmann, A., Gaston, D., Tamas, I., and Roger, A.J. (2007) Novel mitochondrion-related organelles in the anaerobic amoeba *Mastigamoeba balamuthi*. *Mol Microbiol* **66**: 1306-1320.
- Gillin, F.D., and Diamond, L.S. (1978a) Clonal growth of *Entamoeba histolytica* and other species of *Entamoeba* in agar. *J Protozool* **25**: 539-543.





- Gillin, F.D., and Diamond, L.S. (1978b) Clonal growth of *Entamoeba* in agar: some applications of this technique to the study of their cell biology. *Arch Invest Med (Mex)* **9 Suppl 1**: 237-246.
- Gillin, F.D., and Diamond, L.S. (1980) Clonal growth of *Giardia lamblia* trophozoites in a semisolid agarose medium. *J Parasitol* **66**: 350-352.
- Goldberg, A.V., Molik, S., Tsaousis, A.D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., Vivares, C.P., Hirt, R.P., Lill, R., and Embley, T.M. (2008) Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* **452**: 624-628.
- Govind, S.K., Khairul, A.A., and Smith, H.V. (2002) Multiple reproductive processes in *Blastocystis*. *Trends Parasitol* **18**: 528.
- Gray, M.W., Lang, B.F., and Burger, G. (2004) Mitochondria of protists. *Annu Rev Genet* **38**: 477-524.
- Guda, C., Fahy, E., and Subramaniam, S. (2004) MITOPRED: a genome-scale method for prediction of nucleus-encoded mitochondrial proteins. *Bioinformatics* **20**: 1785-1794.
- Gupta, R., and Parsi, K. (2006) Chronic urticaria due to *Blastocystis hominis*. *Australas J Dermatol* **47**: 117-119.
- Gupta, R.S. (1995) Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **15**: 1-11.
- Hackstein, J.H., Akhmanova, A., Voncken, F., van Hoek, A., van Alen, T., Boxma, B., Moon-van der Staay, S.Y., van der Staay, G., Leunissen, J., Huynen, M., Rosenberg, J., and Veenhuis, M. (2001) Hydrogenosomes: convergent adaptations of mitochondria to anaerobic environments. *Zoology (Jena)* **104**: 290-302.
- Hackstein, J.H., Tjaden, J., and Huynen, M. (2006) Mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes: products of evolutionary tinkering! *Curr Genet* **50**: 225-245.
- Hameed, D.M., Hassanin, O.M., and Zuel-Fakkar, N.M. (2010) Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitol Res* **108**: 553-560.
- Hampl, V., Silberman, J.D., Stechmann, A., Diaz-Trivino, S., Johnson, P.J., and Roger, A.J. (2008) Genetic evidence for a mitochondriate ancestry in the 'amitochondriate' flagellate *Trimastix pyriformis*. *PLoS One* **3**: e1383.
- Haresh, K., Suresh, K., Khairul Anus, A., and Saminathan, S. (1999) Isolate resistance of *Blastocystis hominis* to metronidazole. *Trop Med Int Health* **4**: 274-277.
- Henderson, B. (2008) Cell stress proteins as modulators of bacteria--host interactions. *Novartis Found Symp* **291**: 141-154; discussion 154-149, 221-144.
- Henriquez, F.L., Richards, T.A., Roberts, F., McLeod, R., and Roberts, C.W. (2005) The unusual mitochondrial compartment of *Cryptosporidium parvum*. *Trends Parasitol* **21**: 68-74.
- Herrmann, J.M. (2003) Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting. *Trends Microbiol* **11**: 74-79.
- Hirata, T., Nakamura, H., Kinjo, N., Hokama, A., Kinjo, F., Yamane, N., and Fujita, J. (2007) Prevalence of *Blastocystis hominis* and *Strongyloides stercoralis* infection in Okinawa, Japan. *Parasitol Res* **101**: 1717-1719.
- Hjort, K., Goldberg, A.V., Tsaousis, A.D., Hirt, R.P., and Embley, T.M. (2010) Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**: 713-727.



- Ho, L.C., Singh, M., Suresh, G., Ng, G.C., and Yap, E.H. (1993) Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitol Res* **79**: 614-616.
- Ho, L.C., Singh, M., Suresh, K., Ng, G.C., and Yap, E.H. (1994) A study of the karyotypic patterns of *Blastocystis hominis* by pulsed-field gradient electrophoresis. *Parasitol Res* **80**: 620-622.
- Hoevers, J., Holman, P., Logan, K., Hommel, M., Ashford, R., and Snowden, K. (2000) Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis hominis* isolates from geographically diverse human hosts. *Parasitol Res* **86**: 57-61.
- Hoevers, J.D., and Snowden, K.F. (2005) Analysis of the ITS region and partial ssu and lsu rRNA genes of *Blastocystis* and *Proteromonas lacertae*. *Parasitology* **131**: 187-196.
- Hoffmeister, M., van der Klei, A., Rotte, C., van Grinsven, K.W., van Hellemond, J.J., Henze, K., Tielens, A.G., and Martin, W. (2004) *Euglena gracilis* rhodoquinone:ubiquinone ratio and mitochondrial proteome differ under aerobic and anaerobic conditions. *J Biol Chem* **279**: 22422-22429.
- Hollander, D.H. (1976) Colonial morphology of *Trichomonas vaginalis* in Agar. *J Parasitol* **62**: 826-828.
- Horner, D.S., Hirt, R.P., Kilvington, S., Lloyd, D., and Embley, T.M. (1996) Molecular data suggest an early acquisition of the mitochondrion endosymbiont. *Proc Biol Sci* **263**: 1053-1059.
- Hotez, P., Cappello, M., Hawdon, J., Beckers, C., and Sakanari, J. (1994) Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*: possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. *J Infect Dis* **170**: 918-926.
- Hrady, I., Hirt, R.P., Dolezal, P., Bardonova, L., Foster, P.G., Tachezy, J., and Embley, T.M. (2004) *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* **432**: 618-622.
- Humphreys, M.J., Ralphs, J., Durrant, L., and Lloyd, D. (1994) Hydrogenosomes in trichomonads are calcium stores and have a transmembrane electrochemical potential. *Biochem Soc Trans* **22**: 324S.
- Hussein, E.M., Hussein, A.M., Eida, M.M., and Atwa, M.M. (2008) Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res* **102**: 853-860.
- Hyman, E.D. (1988) A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem* **174**: 423-436.
- Idris, N.S., Dwipoerwantoro, P.G., Kurniawan, A., and Said, M. (2010) Intestinal parasitic infection of immunocompromised children with diarrhoea: clinical profile and therapeutic response. *J Infect Dev Ctries* **4**: 309-317.
- Iguchi, A., Ebisu, A., Nagata, S., Saitou, Y., Yoshikawa, H., Iwatani, S., and Kimata, I. (2007) Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitol Int* **56**: 107-112.
- Init, I., Mak, J.W., Lokman Hakim, S., and Yong, H.S. (1999) Strain differences in *Blastocystis* isolates as detected by a single set of polymerase chain reaction primers. *Parasitol Res* **85**: 131-134.
- Isaac-Renton, J.L., Cordeiro, C., Sarafis, K., and Shahriari, H. (1993) Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *J Infect Dis* **167**: 431-440.



- Jedelsky, P.L., Dolezal, P., Rada, P., Pyrih, J., Smid, O., Hrdy, I., Sedinova, M., Marcincikova, M., Voleman, L., Perry, A.J., Beltran, N.C., Lithgow, T., and Tachezy, J. (2011) The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS One* **6**: e17285.
- Johnson, A.M., Thanou, A., Boreham, P.F., and Baverstock, P.R. (1989) *Blastocystis hominis*: phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison. *Exp Parasitol* **68**: 283-288.
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Turbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K., Soldati, D., and Beck, E. (1999) Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285**: 1573-1576.
- Jones, M.S., Whipps, C.M., Ganac, R.D., Hudson, N.R., and Boorom, K. (2009) Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. *Parasitol Res* **104**: 341-345.
- Jones, W.R. (1946) The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. *Ann Trop Med Parasitol* **40**: 130-140.
- Kaneda, Y., Horiki, N., Cheng, X.J., Fujita, Y., Maruyama, M., and Tachibana, H. (2001) Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan. *Am J Trop Med Hyg* **65**: 393-396.
- Karlberg, O., Canback, B., Kurland, C.G., and Andersson, S.G. (2000) The dual origin of the yeast mitochondrial proteome. *Yeast* **17**: 170-187.
- Karp, P.D., Paley, S., and Romero, P. (2002) The Pathway Tools software. *Bioinformatics* **18 Suppl 1**: S225-232.
- Katsarou-Katsari, A., Vassalos, C.M., Tzanetou, K., Spanakos, G., Papadopoulou, C., and Vakalis, N. (2008) Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Acta Derm Venereol* **88**: 80-81.
- Keeling, P.J., and Palmer, J.D. (2008) Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet* **9**: 605-618.
- Keeling, P.J. (2009) Functional and ecological impacts of horizontal gene transfer in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **19**: 613-619.
- Klemba, M., and Goldberg, D.E. (2002) Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem* **71**: 275-305.
- Kobayashi, M., Matsuo, Y., Takimoto, A., Suzuki, S., Maruo, F., and Shoun, H. (1996) Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *J Biol Chem* **271**: 16263-16267.
- Kucknoor, A.S., Mundodi, V., and Alderete, J.F. (2005) Heterologous expression in *Trichomonas foetus* of functional *Trichomonas vaginalis* AP65 adhesin. *BMC Mol Biol* **6**: 5.
- Kulda, J. (1999) Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int J Parasitol* **29**: 199-212.
- Kulik, R.A., Falavigna, D.L., Nishi, L., and Araujo, S.M. (2008) *Blastocystis* sp. and other intestinal parasites in hemodialysis patients. *Braz J Infect Dis* **12**: 338-341.
- Kurland, C.G., and Andersson, S.G. (2000) Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 786-820.



- Kurniawan, A., Karyadi, T., Dwintasari, S.W., Sari, I.P., Yuniastuti, E., Djauzi, S., and Smith, H.V. (2009) Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **103**: 892-898.
- Lahti, C.J., Bradley, P.J., and Johnson, P.J. (1994) Molecular characterization of the alpha-subunit of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase. *Mol Biochem Parasitol* **66**: 309-318.
- Lama, A., Kucknoor, A., Mundodi, V., and Alderete, J.F. (2009) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* **77**: 2703-2711.
- Lancaster, C.R. (2002) Succinate:quinone oxidoreductases: an overview. *Biochim Biophys Acta* **1553**: 1-6.
- Lander, E.S., and Linton, L.M., and Birren, B., and Nusbaum, C., and Zody, M.C., and Baldwin, J., and Devon, K., and Dewar, K., and Doyle, M., and FitzHugh, W., and Funke, R., and Gage, D., and Harris, K., and Heaford, A., and Howland, J., and Kann, L., and Lehoczky, J., and Levine, R., and McEwan, P., and McKernan, K., and Meldrim, J., and Mesirov, J.P., and Miranda, C., and Morris, W., and Naylor, J., and Raymond, C., and Rosetti, M., and Santos, R., and Sheridan, A., and Sougnez, C., and Stange-Thomann, N., and Stojanovic, N., and Subramanian, A., and Wyman, D., and Rogers, J., and Sulston, J., and Ainscough, R., and Beck, S., and Bentley, D., and Burton, J., and Clee, C., and Carter, N., and Coulson, A., and Deadman, R., and Deloukas, P., and Dunham, A., and Dunham, I., and Durbin, R., and French, L., and Grafham, D., and Gregory, S., and Hubbard, T., and Humphray, S., and Hunt, A., and Jones, M., and Lloyd, C., and McMurray, A., and Matthews, L., and Mercer, S., and Milne, S., and Mullikin, J.C., and Mungall, A., and Plumb, R., and Ross, M., and Shownkeen, R., and Sims, S., and Waterston, R.H., and Wilson, R.K., and Hillier, L.W., and McPherson, J.D., and Marra, M.A., and Mardis, E.R., and Fulton, L.A., and Chinwalla, A.T., and Pepin, K.H., and Gish, W.R., and Chissoe, S.L., and Wendl, M.C., and Delehaunty, K.D., and Miner, T.L., and Delehaunty, A., and Kramer, J.B., and Cook, L.L., and Fulton, R.S., and Johnson, D.L., and Minx, P.J., and Clifton, S.W., and Hawkins, T., and Branscomb, E., and Predki, P., and Richardson, P., and Wenning, S., and Slezak, T., and Doggett, N., and Cheng, J.F., and Olsen, A., and Lucas, S., and Elkin, C., and Uberbacher, E., and Frazier, M., and Gibbs, R.A., and Muzny, D.M., and Scherer, S.E., and Bouck, J.B., and Sodergren, E.J., and Worley, K.C., and Rives, C.M., and Gorrell, J.H., and Metzker, M.L., and Naylor, S.L., and Kucherlapati, R.S., and Nelson, D.L., and Weinstock, G.M., and Sakaki, Y., and Fujiyama, A., and Hattori, M., and Yada, T., and Toyoda, A., and Itoh, T., and Kawagoe, C., and Watanabe, H., and Totoki, Y., and Taylor, T., and Weissenbach, J., and Heilig, R., and Saurin, W., and Artiguenave, F., and Brottier, P., and Bruls, T., and Pelletier, E., and Robert, C., and Wincker, P., and Smith, D.R., and Doucette-Stamm, L., and Rubenfield, M., and Weinstock, K., and Lee, H.M., and Dubois, J., and Rosenthal, A., and Platzner, M., and Nyakatura, G., and Taudien, S., and Rump, A., and Yang, H., and Yu, J., and Wang, J., and Huang, G., and Gu, J., and Hood, L., and Rowen, L., and Madan, A., and Qin, S., and Davis, R.W., and Federspiel, N.A., and Abola, A.P., and Proctor, M.J., and Myers, R.M., and Schmutz, J., and Dickson, M., and Grimwood, J., and Cox, D.R., and Olson, M.V., and Kaul, R., and Raymond, C., and Shimizu, N., and Kawasaki, K., and Minoshima, S., and Evans, G.A., and Athanasiou, M., and Schultz, R., and Roe, B.A., and Chen, F., and Pan, H., and Ramser, J., and Lehrach, H., and Reinhardt, R., and McCombie, W.R., and de la Bastide, M., and Dedhia, N., and Blocker, H., and Hornischer, K., and Nordsiek, G., and Agarwala, R., and Aravind, L., and Bailey, J.A., and Bateman, A., and Batzoglu, S., and Birney, E., and Bork, P., and Brown, D.G., and Burge, C.B., and Cerutti, L., and Chen, H.C., and Church, D., and Clamp, M., and Copley, R.R., and Doerks, T., and Eddy, S.R., and Eichler, E.E., and Furey, T.S., and Galagan, J., and Gilbert, J.G., and Harmon, C., and Hayashizaki,





- Y., and Haussler, D., and Hermjakob, H., and Hokamp, K., and Jang, W., and Johnson, L.S., and Jones, T.A., and Kasif, S., and Kasprzyk, A., and Kennedy, S., and Kent, W.J., and Kitts, P., and Koonin, E.V., and Korf, I., and Kulp, D., and Lancet, D., and Lowe, T.M., and McLysaght, A., and Mikkelsen, T., and Moran, J.V., and Mulder, N., and Pollara, V.J., and Ponting, C.P., and Schuler, G., and Schultz, J., and Slater, G., and Smit, A.F., and Stupka, E., and Szustakowski, J., and Thierry-Mieg, D., and Thierry-Mieg, J., and Wagner, L., and Wallis, J., and Wheeler, R., and Williams, A., and Wolf, Y.I., and Wolfe, K.H., and Yang, S.P., and Yeh, R.F., and Collins, F., and Guyer, M.S., and Peterson, J., and Felsenfeld, A., and Wetterstrand, K.A., and Patrinos, A., and Morgan, M.J., and de Jong, P., and Catanese, J.J., and Osoegawa, K., and Shizuya, H., and Choi, S., and Chen, Y.J. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.
- Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., and Gray, M.W. (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**: 493-497.
- Lang, B.F., Gray, M.W., and Burger, G. (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* **33**: 351-397.
- Lantsman, Y., Tan, K.S., Morada, M., and Yarlett, N. (2008) Biochemical characterization of a mitochondrial-like organelle from *Blastocystis* sp. subtype 7. *Microbiology* **154**: 2757-2766.
- Lanuza, M.D., Carbajal, J.A., and Borrás, R. (1996) Identification of surface coat carbohydrates in *Blastocystis hominis* by lectin probes. *Int J Parasitol* **26**: 527-532.
- Lanuza, M.D., Carbajal, J.A., Villar, J., and Borrás, R. (1997) Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. *Parasitol Res* **83**: 60-63.
- Law, C.J., Maloney, P.C., and Wang, D.N. (2008) Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol* **62**: 289-305.
- Lee, I., Bender, E., and Kadenbach, B. (2002) Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase. *Mol Cell Biochem* **234-235**: 63-70.
- Leelayoova, S., Taamasri, P., Rangsin, R., Naaglor, T., Thathaisong, U., and Mungthin, M. (2002) In-vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Ann Trop Med Parasitol* **96**: 803-807.
- Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Thathaisong, U., Naaglor, T., Taamasri, P., Piyaraj, P., and Mungthin, M. (2008) Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am J Trop Med Hyg* **79**: 401-406.
- Li, L., Brunk, B.P., Kissinger, J.C., Pape, D., Tang, K., Cole, R.H., Martin, J., Wylie, T., Dante, M., Fogarty, S.J., Howe, D.K., Liberator, P., Diaz, C., Anderson, J., White, M., Jerome, M.E., Johnson, E.A., Radke, J.A., Stoeckert, C.J., Jr., Waterston, R.H., Clifton, S.W., Roos, D.S., and Sibley, L.D. (2003) Gene discovery in the apicomplexa as revealed by EST sequencing and assembly of a comparative gene database. *Genome Res* **13**: 443-454.
- Li, L.H., Zhang, X.P., Lv, S., Zhang, L., Yoshikawa, H., Wu, Z., Steinmann, P., Utzinger, J., Tong, X.M., Chen, S.H., and Zhou, X.N. (2007a) Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol Res* **102**: 83-90.
- Li, L.H., Zhou, X.N., Du, Z.W., Wang, X.Z., Wang, L.B., Jiang, J.Y., Yoshikawa, H., Steinmann, P., Utzinger, J., Wu, Z., Chen, J.X., Chen, S.H., and Zhang, L. (2007b) Molecular



- epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitol Int* **56**: 281-286.
- Lill, R., Diekert, K., Kaut, A., Lange, H., Pelzer, W., Prohl, C., and Kispal, G. (1999) The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem* **380**: 1157-1166.
- Lill, R., and Kispal, G. (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **25**: 352-356.
- Lill, R. (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831-838.
- Lindmark, D.G., and Muller, M. (1973) Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Trichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem* **248**: 7724-7728.
- Lindmark, D.G., Muller, M., and Shio, H. (1975) Hydrogenosome in *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.* **63**: 552-554.
- Liu, Y., Motyka, S.A., and Englund, P.T. (2005) Effects of RNA interference of *Trypanosoma brucei* structure-specific endonuclease-I on kinetoplast DNA replication. *J Biol Chem* **280**: 35513-35520.
- Liu, Y., and Englund, P.T. (2007) The rotational dynamics of kinetoplast DNA replication. *Mol Microbiol* **64**: 676-690.
- Lloyd, D., Ralphs, J.R., and Harris, J.C. (2002) *Giardia intestinalis*, a eukaryote without hydrogenosomes, produces hydrogen. *Microbiology* **148**: 727-733.
- Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U.C., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R.P., Mann, B.J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Bhattacharya, A., Chillingworth, T., Churcher, C., Hance, Z., Harris, B., Harris, D., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Squares, R., Whitehead, S., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Norbertczak, H., Price, C., Wang, Z., Guillen, N., Gilchrist, C., Stroup, S.E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P.G., Sicheritz-Ponten, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., El-Sayed, N.M., Petri, W.A., Jr., Clark, C.G., Embley, T.M., Barrell, B., Fraser, C.M., and Hall, N. (2005) The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**: 865-868.
- Long, H.Y., Handschack, A., Konig, W., and Ambrosch, A. (2001) *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitol Res* **87**: 1029-1030.
- Loyd, D. (1974) *The Mitochondria of Microorganisms*. Academic Press, London.
- Maas, S. (2010) Gene regulation through RNA editing. *Discov Med* **10**: 379-386.
- Maeda, K., Nagata, H., Yamamoto, Y., Tanaka, M., Tanaka, J., Minamino, N., and Shizukuishi, S. (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis* functions as a coadhesin for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infect Immun* **72**: 1341-1348.
- Mai, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Rosenthal, B., Rogers, R., and Samuelson, J. (1999) Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Biol* **19**: 2198-2205.
- Maltsev, N., Glass, E., Sulakhe, D., Rodriguez, A., Syed, M.H., Bompada, T., Zhang, Y., and D'Souza, M. (2006) PUMA2--grid-based high-throughput analysis of genomes and metabolic pathways. *Nucleic Acids Res* **34**: D369-372.



- Mansour, N.S., Mikhail, E.M., el Masry, N.A., Sabry, A.G., and Mohareb, E.W. (1995) Biochemical characterisation of human isolates of *Blastocystis hominis*. *J Med Microbiol* **42**: 304-307.
- Margulis, L. (1970) Origin of Eukaryotic Cells: Evidence and Research Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant, and Animal Cells on the Precambrian Earth. *New Haven, CT: Yale Univ. Press*. **349 pp**.
- Maruyama, S., Misawa, K., Iseki, M., Watanabe, M., and Nozaki, H. (2008) Origins of a cyanobacterial 6-phosphogluconate dehydrogenase in plastid-lacking eukaryotes. *BMC Evol Biol* **8**: 151.
- McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P.J., and Bouvier, J. (1993) The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* **47**: 821-853.
- Melo, E.J., Attias, M., and De Souza, W. (2000) The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J Struct Biol* **130**: 27-33.
- Meloni, D., Sanci, G., Poirier, P., El Alaoui, H., Chabe, M., Delhaes, L., Dei-Cas, E., Delbac, F., Luigi Fiori, P., Di Cave, D., and Viscogliosi, E. (2011) Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitol Res*.
- Melville, S.E. (1997) Parasite genome analysis. Genome research in *Trypanosoma brucei*: chromosome size polymorphism and its relevance to genome mapping and analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **91**: 116-120.
- Mirza, H., and Tan, K.S. (2009) *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitol Res* **104**: 355-361.
- Mirza, H., Teo, J.D., Upcroft, J., and Tan, K.S. (2010) A rapid, high-throughput viability assay for *Blastocystis* spp. reveals metronidazole resistance and extensive subtype-dependent variations in drug susceptibilities. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 637-648.
- Moberg, P., Nilsson, S., Stahl, A., Eriksson, A.C., Glaser, E., and Maler, L. (2004) NMR solution structure of the mitochondrial F1beta presequence from *Nicotiana plumbaginifolia*. *J Mol Biol* **336**: 1129-1140.
- Moe, K.T., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Ng, G.C., Chen, X.Q., and Yap, E.H. (1996) Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitol Res* **82**: 439-444.
- Moe, K.T., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Chen, X.Q., Ng, G.C., and Yap, E.H. (1997) Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitol Res* **83**: 319-325.
- Moe, K.T., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Chen, X.Q., and Yap, E.H. (1999) Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitol Res* **85**: 103-108.
- Moghaddam, D.D., Ghadirian, E., and Azami, M. (2005) *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Parasitol Res* **96**: 273-275.
- Moreno-Brito, V., Yanez-Gomez, C., Meza-Cervantes, P., Avila-Gonzalez, L., Rodriguez, M.A., Ortega-Lopez, J., Gonzalez-Robles, A., and Arroyo, R. (2005) A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell Microbiol* **7**: 245-258.
- Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A.C., and Kanehisa, M. (2007) KAAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* **35**: W182-185.



- Mueller, L.A., Zhang, P., and Rhee, S.Y. (2003) AraCyc: a biochemical pathway database for Arabidopsis. *Plant Physiol* **132**: 453-460.
- Mukherjee, M., Brown, M.T., McArthur, A.G., and Johnson, P.J. (2006a) Proteins of the glycine decarboxylase complex in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell* **5**: 2062-2071.
- Mukherjee, M., Sievers, S.A., Brown, M.T., and Johnson, P.J. (2006b) Identification and biochemical characterization of serine hydroxymethyl transferase in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell* **5**: 2072-2078.
- Muller, H.E. (1994) Four serologically different groups within the species *Blastocystis hominis*. *Zentralbl Bakteriol* **280**: 403-408.
- Muller, M. (1993) The hydrogenosome. *J Gen Microbiol* **139**: 2879-2889.
- Mundodi, V., Kucknoor, A.S., Klumpp, D.J., Chang, T.H., and Alderete, J.F. (2004) Silencing the ap65 gene reduces adherence to vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* **53**: 1099-1108.
- Nasirudeen, A.M., Tan, K.S., Singh, M., and Yap, E.H. (2001) Programmed cell death in a human intestinal parasite, *Blastocystis hominis*. *Parasitology* **123**: 235-246.
- Nasirudeen, A.M., and Tan, K.S. (2004) Isolation and characterization of the mitochondrion-like organelle from *Blastocystis hominis*. *J Microbiol Methods* **58**: 101-109.
- Navarrete, N., and Torres, P. (1994) [Prevalence of infection by intestinal helminths and protozoa in school children from a coastal locality in the province of Valdivia, Chile]. *Bol Chil Parasitol* **49**: 79-80.
- Ng, G.C., and Tan, K.S.W. (1999) Colony growth as a step towards axenization of *Blastocystis* isolates. *Parasitol. Res.* **85**: 678-679.
- Ng, S.T., Sanusi Jangi, M., Shirley, M.W., Tomley, F.M., and Wan, K.L. (2002) Comparative EST analyses provide insights into gene expression in two asexual developmental stages of *Eimeria tenella*. *Exp Parasitol* **101**: 168-173.
- Nickel, R., and Tannich, E. (1994) Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7095-7098.
- Nigro, L., Larocca, L., Massarelli, L., Patamia, I., Minniti, S., Palermo, F., and Cacopardo, B. (2003) A placebo-controlled treatment trial of *Blastocystis hominis* infection with metronidazole. *J Travel Med* **10**: 128-130.
- Nixon, J.E., Wang, A., Field, J., Morrison, H.G., McArthur, A.G., Sogin, M.L., Loftus, B.J., and Samuelson, J. (2002) Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, NADH oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* **1**: 181-190.
- Noel, C., Peyronnet, C., Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Delgado-Viscogliosi, P., Sogin, M.L., Capron, M., Viscogliosi, E., and Zenner, L. (2003) Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from different hosts based on the comparison of small-subunit rRNA gene sequences. *Mol Biochem Parasitol* **126**: 119-123.
- Noel, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, L.C., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, M.L., Capron, M., Pierce, R., Zenner, L., and Viscogliosi, E. (2005) Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol* **43**: 348-355.





- O'Gorman, M.A., Orenstein, S.R., Proujansky, R., Wadowsky, R.M., Putnam, P.E., and Kocoshis, S.A. (1993) Prevalence and characteristics of *Blastocystis hominis* infection in children. *Clin Pediatr (Phila)* **32**: 91-96.
- Ozyurt, M., Kurt, O., Molbak, K., Nielsen, H.V., Haznedaroglu, T., and Stensvold, C.R. (2008) Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol Int* **57**: 300-306.
- Painter, H.J., Morrissey, J.M., Mather, M.W., and Vaidya, A.B. (2007) Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature* **446**: 88-91.
- Pancholi, V., and Fischetti, V.A. (1993) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A streptococci is also an ADP-ribosylating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8154-8158.
- Papa, S., Sardanelli, A.M., Scacco, S., Petruzzella, V., Technikova-Dobrova, Z., Vergari, R., and Signorile, A. (2002) The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) of the mammalian respiratory chain and the cAMP cascade. *J Bioenerg Biomembr* **34**: 1-10.
- Parkar, U., Traub, R.J., Kumar, S., Mungthin, M., Vitali, S., Leelayoova, S., Morris, K., and Thompson, R.C. (2007) Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology* **134**: 359-367.
- Parkar, U., Traub, R.J., Vitali, S., Elliot, A., Levecke, B., Robertson, I., Geurden, T., Steele, J., Drake, B., and Thompson, R.C. (2010) Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol* **169**: 8-17.
- Paul, R.G., Williams, A.G., and Butler, R.D. (1990) Hydrogenosomes in the rumen entodiniomorphid ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *J Gen Microbiol* **136**: 1981-1989.
- Pedersen, P.L. (1999) Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview. *J Bioenerg Biomembr* **31**: 291-304.
- Pegelow, K., Gross, R., Pietrzik, K., Lukito, W., Richards, A.L., and Fryauff, D.J. (1997) Parasitological and nutritional situation of school children in the Sukaraja district, West Java, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **28**: 173-190.
- Perez-Brocal, V., and Clark, C.G. (2008) Analysis of two genomes from the mitochondrion-like organelle of the intestinal parasite *Blastocystis*: complete sequences, gene content, and genome organization. *Mol Biol Evol* **25**: 2475-2482.
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., El Alaoui, H., Delbac, F., and Livrelli, V. (2011) Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* **49**: 975-983.
- Prasad, K.N., Nag, V.L., Dhole, T.N., and Ayyagari, A. (2000) Identification of enteric pathogens in HIV-positive patients with diarrhoea in northern India. *J Health Popul Nutr* **18**: 23-26.
- Purdy, J.E., Mann, B.J., Pho, L.T., and Petri, W.A., Jr. (1994) Transient transfection of the enteric parasite *Entamoeba histolytica* and expression of firefly luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7099-7103.
- Puthia, M.K., Vaithilingam, A., Lu, J., and Tan, K.S. (2005) Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol Res* **97**: 386-389.



- Puthia, M.K., Sio, S.W., Lu, J., and Tan, K.S. (2006) Blastocystis ratti induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infect Immun* **74**: 4114-4123.
- Puthia, M.K., Lu, J., and Tan, K.S. (2008) Blastocystis ratti contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappaB-dependent manner. *Eukaryot Cell* **7**: 435-443.
- Putignani, L., Tait, A., Smith, H.V., Horner, D., Tovar, J., Tetley, L., and Wastling, J.M. (2004) Characterization of a mitochondrion-like organelle in Cryptosporidium parvum. *Parasitology* **129**: 1-18.
- Rayan, H.Z., Ismail, O.A., and El Gayar, E.K. (2007) Prevalence and clinical features of Dientamoeba fragilis infections in patients suspected to have intestinal parasitic infection. *J Egypt Soc Parasitol* **37**: 599-608.
- Riordan, C.E., Ault, J.G., Langreth, S.G., and Keithly, J.S. (2003) Cryptosporidium parvum Cpn60 targets a relict organelle. *Curr Genet* **44**: 138-147.
- Rivera, M.C., Jain, R., Moore, J.E., and Lake, J.A. (1998) Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6239-6244.
- Rivera, W.L., and Tan, M.A. (2005) Molecular characterization of Blastocystis isolates in the Philippines by riboprinting. *Parasitol Res* **96**: 253-257.
- Rivera, W.L. (2008) Phylogenetic analysis of Blastocystis isolates from animal and human hosts in the Philippines. *Vet Parasitol* **156**: 178-182.
- Rodrigues Goulart, H., Kimura, E.A., Peres, V.J., Couto, A.S., Aquino Duarte, F.A., and Katzin, A.M. (2004) Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2502-2509.
- Roger, A.J., Clark, C.G., and Doolittle, W.F. (1996) A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist Trichomonas vaginalis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14618-14622.
- Romero, P., Wagg, J., Green, M.L., Kaiser, D., Krummenacker, M., and Karp, P.D. (2005) Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome. *Genome Biol* **6**: R2.
- Ronaghi, M., Pettersson, B., Uhlen, M., and Nyren, P. (1998a) PCR-introduced loop structure as primer in DNA sequencing. *Biotechniques* **25**: 876-878, 880-872, 884.
- Ronaghi, M., Uhlen, M., and Nyren, P. (1998b) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* **281**: 363, 365.
- Rossignol, J.F., Kabil, S.M., Said, M., Samir, H., and Younis, A.M. (2005) Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with Blastocystis hominis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **3**: 987-991.
- Sajid, M., and McKerrow, J.H. (2002) Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* **120**: 1-21.
- Saksirisampant, W., Nuchprayoon, S., Wiwanitkit, V., Yenthakam, S., and Ampavasiri, A. (2003) Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Pathum Thani province. *J Med Assoc Thai* **86 Suppl 2**: S263-270.
- Saksirisampant, W., Prownobon, J., Kulkumthorn, M., Yenthakam, S., Janpla, S., and Nuchprayoon, S. (2006) Prevalence of intestinal parasitic infections among school children in the central region of Thailand. *J Med Assoc Thai* **89**: 1928-1933.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.



- Santin, M., Gomez-Munoz, M.T., Solano-Aguilar, G., and Fayer, R. (2011) Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res*.
- Scicluna, S.M., Tawari, B., and Clark, C.G. (2006) DNA barcoding of *blastocystis*. *Protist* **157**: 77-85.
- Scott, D.A., North, M.J., and Coombs, G.H. (1995) *Trichomonas vaginalis*: amoeboid and flagellated forms synthesize similar proteinases. *Exp Parasitol* **80**: 345-348.
- Shapiro, T.A., and Englund, P.T. (1995) The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* **49**: 117-143.
- Shariff, K., Ghosal, S., and Matouschek, A. (2004) The force exerted by the membrane potential during protein import into the mitochondrial matrix. *Biophys J* **86**: 3647-3652.
- Shiflett, A.M., and Johnson, P.J. (2010) Mitochondrion-related organelles in eukaryotic protists. *Annu Rev Microbiol* **64**: 409-429.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13207-13212.
- Silberman, J.D., Sogin, M.L., Leipe, D.D., and Clark, C.G. (1996) Human parasite finds taxonomic home. *Nature* **380**: 398.
- Singh, M., Suresh, K., Ho, L.C., Ng, G.C., and Yap, E.H. (1995) Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* **81**: 446-450.
- Singh, M., Ho, L.C., Yap, A.L., Ng, G.C., Tan, S.W., Moe, K.T., and Yap, E.H. (1996) Axenic culture of reptilian *Blastocystis* isolates in monophasic medium and speciation by karyotypic typing. *Parasitol Res* **82**: 165-169.
- Sio, S.W., Puthia, M.K., Lee, A.S., Lu, J., and Tan, K.S. (2006) Protease activity of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* **99**: 126-130.
- Smith, D.A. (1986) Human genome sequencing. *Science* **233**: 1246.
- Souppart, L., Sanciu, G., Cian, A., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Capron, M., Dei-Cas, E., Boorom, K., Delhaes, L., and Viscogliosi, E. (2009) Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res* **105**: 413-421.
- Souppart, L., Moussa, H., Cian, A., Sanciu, G., Poirier, P., El Alaoui, H., Delbac, F., Boorom, K., Delhaes, L., Dei-Cas, E., and Viscogliosi, E. (2010) Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res* **106**: 505-511.
- Stark, D., van Hal, S., Marriott, D., Ellis, J., and Harkness, J. (2007) Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *Int J Parasitol* **37**: 11-20.
- Stechmann, A., Hamblin, K., Perez-Brocal, V., Gaston, D., Richmond, G.S., van der Giezen, M., Clark, C.G., and Roger, A.J. (2008) Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Biol* **18**: 580-585.
- Stensvold, C.R., Arendrup, M.C., Jespersgaard, C., Molbak, K., and Nielsen, H.V. (2007a) Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis* **59**: 303-307.
- Stensvold, C.R., Suresh, G.K., Tan, K.S., Thompson, R.C., Traub, R.J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H., and Clark, C.G. (2007b) Terminology for *Blastocystis* subtypes--a consensus. *Trends Parasitol* **23**: 93-96.



- Stensvold, C.R., Arendrup, M.C., Nielsen, H.V., Bada, A., and Thorsen, S. (2008) Symptomatic infection with *Blastocystis* sp. subtype 8 successfully treated with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Ann Trop Med Parasitol* **102**: 271-274.
- Stensvold, C.R., Alfellani, M.A., Norskov-Lauritsen, S., Prip, K., Victory, E.L., Maddox, C., Nielsen, H.V., and Clark, C.G. (2009a) Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol* **39**: 473-479.
- Stensvold, C.R., Lewis, H.C., Hammerum, A.M., Porsbo, L.J., Nielsen, S.S., Olsen, K.E., Arendrup, M.C., Nielsen, H.V., and Molbak, K. (2009b) *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect* **137**: 1655-1663.
- Stensvold, C.R., Smith, H.V., Nagel, R., Olsen, K.E., and Traub, R.J. (2010) Eradication of *Blastocystis* carriage with antimicrobials: reality or delusion? *J Clin Gastroenterol* **44**: 85-90.
- Stensvold, C.R., Christiansen, D.B., Olsen, K.E., and Nielsen, H.V. (2011) *Blastocystis* sp. Subtype 4 is Common in Danish *Blastocystis*-Positive Patients Presenting with Acute Diarrhea. *Am J Trop Med Hyg* **84**: 883-885.
- Stensvold, R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H.V., and Arendrup, M.C. (2006) Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol* **92**: 1081-1087.
- Stenzel, D.J., Boreham, P.F., and McDougall, R. (1991) Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. *Int J Parasitol* **21**: 807-812.
- Stenzel, D.J., and Boreham, P.F. (1996) *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev* **9**: 563-584.
- Stuart, K., and Panigrahi, A.K. (2002) RNA editing: complexity and complications. *Mol Microbiol* **45**: 591-596.
- Sun, C.H., McCaffery, J.M., Reiner, D.S., and Gillin, F.D. (2003) Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins. *J Biol Chem* **278**: 21701-21708.
- Suresh, K., Ng, G.C., Ramachandran, N.P., Ho, L.C., Yap, E.H., and Singh, M. (1993) In vitro encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* **79**: 456-460.
- Suresh, K., Howe, J., Chong, S.Y., Ng, G.C., Ho, L.C., Loh, A.K., Ramachandran, N.P., Yap, E.H., and Singh, M. (1994a) Ultrastructural changes during in vitro encystment of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* **80**: 327-335.
- Suresh, K., Howe, J., Ng, G.C., Ho, L.C., Ramachandran, N.P., Loh, A.K., Yap, E.H., and Singh, M. (1994b) A multiple fission-like mode of asexual reproduction in *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* **80**: 523-527.
- Suresh, K., Init, I., Reuel, P.A., Rajah, S., Lokman, H., and Khairul Anuar, A. (1998) Glycerol with fetal calf serum--a better cryoprotectant for *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* **84**: 321-322.
- Suresh, K., and Smith, H. (2004) Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**: 509-511.
- Surolia, N., and Padmanaban, G. (1992) de novo biosynthesis of heme offers a new chemotherapeutic target in the human malarial parasite. *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 744-750.





- Surolia, N., and Surolia, A. (2001) Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*. *Nat Med* **7**: 167-173.
- Sutak, R., Chamot, C., Tachezy, J., Camadro, J.M., and Lesuisse, E. (2004) Siderophore and haem iron use by *Tritrichomonas foetus*. *Microbiology* **150**: 3979-3987.
- Swayne, J.G. (1849) An account of certain organic cells peculiar to the evacuations of cholera. *Lancet* **2**: 368-371.
- Taamasri, P., Mungthin, M., Rangsin, R., Tongupprakarn, B., Areekul, W., and Leelayoova, S. (2000) Transmission of intestinal blastocystosis related to the quality of drinking water. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **31**: 112-117.
- Tachezy, J., Sanchez, L.B., and Muller, M. (2001) Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Mol Biol Evol* **18**: 1919-1928.
- Tai, W.P., Hu, P.J., Wu, J., and Lin, X.C. (2010) Six ulcerative colitis patients with refractory symptoms co-infective with *Blastocystis hominis* in China. *Parasitol Res* **108**: 1207-1210.
- Takaya, N., Suzuki, S., Kuwazaki, S., Shoun, H., Maruo, F., Yamaguchi, M., and Takeo, K. (1999) Cytochrome p450nor, a novel class of mitochondrial cytochrome P450 involved in nitrate respiration in the fungus *Fusarium oxysporum*. *Arch Biochem Biophys* **372**: 340-346.
- Tan, K.S., Howe, J., Yap, E.H., and Singh, M. (2001) Do *Blastocystis hominis* colony forms undergo programmed cell death? *Parasitol Res* **87**: 362-367.
- Tan, K.S., Singh, M., and Yap, E.H. (2002) Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *Int J Parasitol* **32**: 789-804.
- Tan, K.S., and Stenzel, D.J. (2003) Multiple reproductive processes in *Blastocystis*: proceed with caution. *Trends Parasitol* **19**: 290-291; author reply 291-292.
- Tan, K.S. (2004) *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet Parasitol* **126**: 121-144.
- Tan, K.S., and Nasirudeen, A.M. (2005) Protozoan programmed cell death--insights from *Blastocystis* deathstyles. *Trends Parasitol* **21**: 547-550.
- Tan, K.S. (2008) New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* **21**: 639-665.
- Tan, K.S.W., Singh, M., Thong, K.T., Ho, L.C., Moe, K.T., Chen, X.Q., Ng, G.C., and Yap, E.H. (1996a) Clonal growth of *Blastocystis hominis* in soft agar with sodium thioglycollate. *Parasitol. Res.* **82**: 737-739.
- Tan, K.S.W., Singh, M., Yap, E.H., Ho, L.C., Moe, K.T., Howe, J., and Ng, G.C. (1996b) Colony formation of *Blastocystis hominis* in soft agar. *Parasitol. Res.* **82**: 375-377.
- Tan, K.S.W., Ng, G.C., Quek, E., Howe, J., Ramachandran, N.P., Yap, E.H., and Singh, M. (2000) *Blastocystis hominis*: A Simplified, High-Efficiency Method for Clonal Growth on Solid Agar. *Exp. Parasitol.* **96**: 9-15.
- Tan, S.W., Singh, M., Ho, L.C., Howe, J., Moe, K.T., Chen, X.Q., Ng, G.C., and Yap, E.H. (1997) Survival of *Blastocystis hominis* clones after exposure to a cytotoxic monoclonal antibody. *Int J Parasitol* **27**: 947-954.
- Tan, T.C., and Suresh, K.G. (2006a) Amoeboid form of *Blastocystis hominis* - a detailed ultrastructural insight. *Parasitol Res* **99**: 737-742.



- Tan, T.C., and Suresh, K.G. (2006b) Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol Res* **98**: 189-193.
- Tan, T.C., and Suresh, K.G. (2007) Evidence of plasmotomy in *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* **101**: 1521-1525.
- Tan, T.C., Suresh, K.G., and Smith, H.V. (2008) Phenotypic and genotypic characterisation of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential. *Parasitol Res* **104**: 85-93.
- Tan, T.C., Ong, S.C., and Suresh, K.G. (2009) Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitol Res* **105**: 1283-1286.
- Tanizaki, A., Yoshikawa, H., Iwatani, S., and Kimata, I. (2005) Infectivity of *Blastocystis* isolates from chickens, quails and geese in chickens. *Parasitol Res* **96**: 57-61.
- Tasova, Y., Sahin, B., Koltas, S., and Paydas, S. (2000) Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy. *Acta Med Okayama* **54**: 133-136.
- Taylor, S.W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G.M., Warnock, D.E., Wiley, S., Murphy, A.N., Gaucher, S.P., Capaldi, R.A., Gibson, B.W., and Ghosh, S.S. (2003) Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol* **21**: 281-286.
- Termmathurapoj, S., Leelayoova, S., Aimpun, P., Thathaisong, U., Nimmanon, T., Taamasri, P., and Mungthin, M. (2004) The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol Res* **93**: 445-447.
- Thathaisong, U., Worapong, J., Mungthin, M., Tan-Ariya, P., Viputtigul, K., Sudatis, A., Noonai, A., and Leelayoova, S. (2003) *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol* **41**: 967-975.
- Tielens, A.G., and Van Hellemond, J.J. (1998) The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1365**: 71-78.
- Tielens, A.G., Rotte, C., van Hellemond, J.J., and Martin, W. (2002) Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem Sci* **27**: 564-572.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., and Martin, W. (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* **5**: 123-135.
- Tomitsuka, E., Kita, K., and Esumi, H. (2010) The NADH-fumarate reductase system, a novel mitochondrial energy metabolism, is a new target for anticancer therapy in tumor microenvironments. *Ann N Y Acad Sci* **1201**: 44-49.
- Torres, P., Miranda, J.C., Flores, L., Riquelme, J., Franjola, R., Perez, J., Auad, S., Hermosilla, C., and Riquelme, S. (1992) [Blastocystosis and other intestinal protozoan infections in human riverside communities of the Valdivia River basin, Chile]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **34**: 557-564.
- Toscano, M.A., Commodaro, A.G., Ilarregui, J.M., Bianco, G.A., Liberman, A., Serra, H.M., Hirabayashi, J., Rizzo, L.V., and Rabinovich, G.A. (2006) Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol* **176**: 6323-6332.
- Tovar, J., Fischer, A., and Clark, C.G. (1999) The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* **32**: 1013-1021.
- Tovar, J., Leon-Avila, G., Sanchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernandez, M., Muller, M., and Lucocq, J.M. (2003) Mitochondrial remnant



- organelles of Giardia function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**: 172-176.
- Tsaousis, A.D., Kunji, E.R., Goldberg, A.V., Lucocq, J.M., Hirt, R.P., and Embley, T.M. (2008) A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **453**: 553-556.
- Unseld, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P., and Brennicke, A. (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet* **15**: 57-61.
- Vaidya, A.B., and Mather, M.W. (2009) Mitochondrial evolution and functions in malaria parasites. *Annu Rev Microbiol* **63**: 249-267.
- van der Giezen, M., Sjollema, K.A., Artz, R.R., Alkema, W., and Prins, R.A. (1997) Hydrogenosomes in the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* have a double membrane but lack an associated organelle genome. *FEBS Lett* **408**: 147-150.
- van der Giezen, M., Kiel, J.A., Sjollema, K.A., and Prins, R.A. (1998) The hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *neocallimastix frontalis* is targeted to mitochondria of the methylotrophic yeast *hansenula polymorpha*. *Curr Genet* **33**: 131-135.
- van der Giezen, M., Slotboom, D.J., Horner, D.S., Dyal, P.L., Harding, M., Xue, G.P., Embley, T.M., and Kunji, E.R. (2002) Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles. *Embo J* **21**: 572-579.
- van der Giezen, M., Birdsey, G.M., Horner, D.S., Lucocq, J., Dyal, P.L., Benchimol, M., Danpure, C.J., and Embley, T.M. (2003) Fungal hydrogenosomes contain mitochondrial heat-shock proteins. *Mol Biol Evol* **20**: 1051-1061.
- van der Giezen, M., and Tovar, J. (2005) Degenerate mitochondria. *EMBO Rep* **6**: 525-530.
- van Dooren, G.G., Marti, M., Tonkin, C.J., Stimmler, L.M., Cowman, A.F., and McFadden, G.I. (2005) Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **57**: 405-419.
- van Dooren, G.G., Stimmler, L.M., and McFadden, G.I. (2006) Metabolic maps and functions of the *Plasmodium* mitochondrion. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 596-630.
- van Hoek, A.H., Akhmanova, A.S., Huynen, M.A., and Hackstein, J.H. (2000) A mitochondrial ancestry of the hydrogenosomes of *Nyctotherus ovalis*. *Mol Biol Evol* **17**: 202-206.
- Venter, J.C., and Adams, M.D., and Myers, E.W., and Li, P.W., and Mural, R.J., and Sutton, G.G., and Smith, H.O., and Yandell, M., and Evans, C.A., and Holt, R.A., and Gocayne, J.D., and Amanatides, P., and Ballew, R.M., and Huson, D.H., and Wortman, J.R., and Zhang, Q., and Kodira, C.D., and Zheng, X.H., and Chen, L., and Skupski, M., and Subramanian, G., and Thomas, P.D., and Zhang, J., and Gabor Miklos, G.L., and Nelson, C., and Broder, S., and Clark, A.G., and Nadeau, J., and McKusick, V.A., and Zinder, N., and Levine, A.J., and Roberts, R.J., and Simon, M., and Slayman, C., and Hunkapiller, M., and Bolanos, R., and Delcher, A., and Dew, I., and Fasulo, D., and Flanigan, M., and Florea, L., and Halpern, A., and Hannenhalli, S., and Kravitz, S., and Levy, S., and Mobarry, C., and Reinert, K., and Remington, K., and Abu-Threideh, J., and Beasley, E., and Biddick, K., and Bonazzi, V., and Brandon, R., and Cargill, M., and Chandramouliswaran, I., and Charlab, R., and Chaturvedi, K., and Deng, Z., and Di Francesco, V., and Dunn, P., and Eilbeck, K., and Evangelista, C., and Gabrielian, A.E., and Gan, W., and Ge, W., and Gong, F., and Gu, Z., and Guan, P., and Heiman, T.J., and Higgins, M.E., and Ji, R.R., and Ke, Z., and Ketchum, K.A., and



- Lai, Z., and Lei, Y., and Li, Z., and Li, J., and Liang, Y., and Lin, X., and Lu, F., and Merkulov, G.V., and Milshina, N., and Moore, H.M., and Naik, A.K., and Narayan, V.A., and Neelam, B., and Nusskern, D., and Rusch, D.B., and Salzberg, S., and Shao, W., and Shue, B., and Sun, J., and Wang, Z., and Wang, A., and Wang, X., and Wang, J., and Wei, M., and Wides, R., and Xiao, C., and Yan, C., and Yao, A., and Ye, J., and Zhan, M., and Zhang, W., and Zhang, H., and Zhao, Q., and Zheng, L., and Zhong, F., and Zhong, W., and Zhu, S., and Zhao, S., and Gilbert, D., and Baumhueter, S., and Spier, G., and Carter, C., and Cravchik, A., and Woodage, T., and Ali, F., and An, H., and Awe, A., and Baldwin, D., and Baden, H., and Barnstead, M., and Barrow, I., and Beeson, K., and Busam, D., and Carver, A., and Center, A., and Cheng, M.L., and Curry, L., and Danaher, S., and Davenport, L., and Desilets, R., and Dietz, S., and Dodson, K., and Doup, L., and Ferriera, S., and Garg, N., and Gluecksmann, A., and Hart, B., and Haynes, J., and Haynes, C., and Heiner, C., and Hladun, S., and Hostin, D., and Houck, J., and Howland, T., and Ibegwam, C., and Johnson, J., and Kalush, F., and Kline, L., and Koduru, S., and Love, A., and Mann, F., and May, D., and McCawley, S., and McIntosh, T., and McMullen, I., and Moy, M., and Moy, L., and Murphy, B., and Nelson, K., and Pfannkoch, C., and Pratts, E., and Puri, V., and Qureshi, H., and Reardon, M., and Rodriguez, R., and Rogers, Y.H., and Romblad, D., and Ruhfel, B., and Scott, R., and Sitter, C., and Smallwood, M., and Stewart, E., and Strong, R., and Suh, E., and Thomas, R., and Tint, N.N., and Tse, S., and Vech, C., and Wang, G., and Wetter, J., and Williams, S., and Williams, M., and Windsor, S., and Winn-Deen, E., and Wolfe, K., and Zaveri, J., and Zaveri, K., and Abril, J.F., and Guigo, R., and Campbell, M.J., and Sjolander, K.V., and Karlak, B., and Kejariwal, A., and Mi, H., and Lazareva, B., and Hatton, T., and Narechania, A., and Diemer, K., and Muruganujan, A., and Guo, N., and Sato, S., and Bafna, V., and Istrail, S., and Lippert, R., and Schwartz, R., and Walenz, B., and Yooseph, S., and Allen, D., and Basu, A., and Baxendale, J., and Blick, L., and Caminha, M., and Carnes-Stine, J., and Caulk, P., and Chiang, Y.H., and Coyne, M., and Dahlke, C., and Mays, A., and Dombroski, M., and Donnelly, M., and Ely, D., and Esparham, S., and Fosler, C., and Gire, H., and Glanowski, S., and Glasser, K., and Glodek, A., and Gorokhov, M., and Graham, K., and Gropman, B., and Harris, M., and Heil, J., and Henderson, S., and Hoover, J., and Jennings, D., and Jordan, C., and Jordan, J., and Kasha, J., and Kagan, L., and Kraft, C., and Levitsky, A., and Lewis, M., and Liu, X., and Lopez, J., and Ma, D., and Majoros, W., and McDaniel, J., and Murphy, S., and Newman, M., and Nguyen, T., and Nguyen, N., and Nodell, M., and Pan, S., and Peck, J., and Peterson, M., and Rowe, W., and Sanders, R., and Scott, J., and Simpson, M., and Smith, T., and Sprague, A., and Stockwell, T., and Turner, R., and Venter, E., and Wang, M., and Wen, M., and Wu, D., and Wu, M., and Xia, A., and Zandieh, A., and Zhu, X. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351.
- Villar, J., Carbajal, J.A., Lanuza, M.D., Munoz, C., and Borrás, R. (1998) In vitro encystation of *Blastocystis hominis*: a kinetics and cytochemistry study. *Parasitol Res* **84**: 54-58.
- Vogelberg, C., Stensvold, C.R., Monecke, S., Ditzén, A., Stopsack, K., Heinrich-Grafe, U., and Pohlmann, C. (2010) *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitol Int* **59**: 469-471.
- Voncken, F., Boxma, B., Tjaden, J., Akhmanova, A., Huynen, M., Verbeek, F., Tielens, A.G., Haferkamp, I., Neuhaus, H.E., Vogels, G., Veenhuis, M., and Hackstein, J.H. (2002) Multiple origins of hydrogenosomes: functional and phylogenetic evidence from the ADP/ATP carrier of the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. *Mol Microbiol* **44**: 1441-1454.
- Wallace, D.C. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* **39**: 359-407.





- Waller, R.F., Keeling, P.J., Donald, R.G., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A.F., Besra, G.S., Roos, D.S., and McFadden, G.I. (1998) Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12352-12357.
- Waller, R.F., Ralph, S.A., Reed, M.B., Su, V., Douglas, J.D., Minnikin, D.E., Cowman, A.F., Besra, G.S., and McFadden, G.I. (2003) A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 297-301.
- Wawrzyniak, I., Roussel, M., Diogon, M., Couloux, A., Texier, C., Tan, K.S., Vivares, C.P., Delbac, F., Wincker, P., and El Alaoui, H. (2008) Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis hominis*. *Int J Parasitol* **38**: 1377-1382.
- Whatley, J.M., John, P., and Whatley, F.R. (1979) From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **204**: 165-187.
- Whipps, C.M., Boorom, K., Bermudez, L.E., and Kent, M.L. (2010) Molecular characterization of *Blastocystis* species in Oregon identifies multiple subtypes. *Parasitol Res* **106**: 827-832.
- Williams, B.A., Hirt, R.P., Lucocq, J.M., and Embley, T.M. (2002) A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* **418**: 865-869.
- Williams, B.A., and Keeling, P.J. (2003) Cryptic organelles in parasitic protists and fungi. *Adv Parasitol* **54**: 9-68.
- Williams, B.A., Haferkamp, I., and Keeling, P.J. (2008) An ADP/ATP-specific mitochondrial carrier protein in the microsporidian *Antonosporea locustae*. *J Mol Biol* **375**: 1249-1257.
- Williamson, D.H., Gardner, M.J., Preiser, P., Moore, D.J., Rangachari, K., and Wilson, R.J. (1994) The evolutionary origin of the 35 kb circular DNA of *Plasmodium falciparum*: new evidence supports a possible rhodophyte ancestry. *Mol Gen Genet* **243**: 249-252.
- Wilson, R.J., Denny, P.W., Preiser, P.R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D.J., Moore, P.W., and Williamson, D.H. (1996) Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* **261**: 155-172.
- Windsor, J.J., Stenzel, D.J., and Macfarlane, L. (2003) Multiple reproductive processes in *Blastocystis hominis*. *Trends Parasitol* **19**: 289-290; author reply 291-282.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4576-4579.
- Wong, K.H., Ng, G.C., Lin, R.T., Yoshikawa, H., Taylor, M.B., and Tan, K.S. (2008) Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitol Res* **102**: 663-670.
- Wu, B., Yin, J., Texier, C., Roussel, M., and Tan, K.S. (2010) *Blastocystis* legumain is localized on the cell surface, and specific inhibition of its activity implicates a pro-survival role for the enzyme. *J Biol Chem* **285**: 1790-1798.
- Yaicharoen, R., Ngrenngarmmlert, W., Wongjindanon, N., Sripochang, S., and Kiatfuengfoo, R. (2006) Infection of *Blastocystis hominis* in primary schoolchildren from Nakhon Pathom province, Thailand. *Trop Biomed* **23**: 117-122.



- Yakoob, J., Jafri, W., Jafri, N., Islam, M., and Asim Beg, M. (2004a) In vitro susceptibility of *Blastocystis hominis* isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Br J Biomed Sci* **61**: 75-77.
- Yakoob, J., Jafri, W., Jafri, N., Khan, R., Islam, M., Beg, M.A., and Zaman, V. (2004b) Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. *Am J Trop Med Hyg* **70**: 383-385.
- Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M.A., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M., and Khan, R. (2010a) Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* **106**: 1033-1038.
- Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M.A., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M., and Khan, R. (2010b) *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol Res* **107**: 679-684.
- Yamamoto-Furusho, J.K., and Torijano-Carrera, E. (2010) Intestinal protozoa infections among patients with ulcerative colitis: prevalence and impact on clinical disease course. *Digestion* **82**: 18-23.
- Yan, Y., Su, S., Lai, R., Liao, H., Ye, J., Li, X., Luo, X., and Chen, G. (2006) Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitol Res* **99**: 597-601.
- Yan, Y., Su, S., Ye, J., Lai, X., Lai, R., Liao, H., Chen, G., Zhang, R., Hou, Z., and Luo, X. (2007) *Blastocystis* sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype. *Parasitol Res* **101**: 1527-1532.
- Yarlett, N., Orpin, C.G., Munn, E.A., Yarlett, N.C., and Greenwood, C.A. (1986) Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem J* **236**: 729-739.
- Yarlett, N. (1994) Fermentation product generation in rumen chytridiomycetes. Mountfort DO, Orpin CG, eds. *Anaerobic fungi*. New York: marcel Dekker: 129-146.
- Yeh, I., Hanekamp, T., Tsoka, S., Karp, P.D., and Altman, R.B. (2004) Computational analysis of *Plasmodium falciparum* metabolism: organizing genomic information to facilitate drug discovery. *Genome Res* **14**: 917-924.
- Yoshikawa, H., Kuwayama, N., and Enose, Y. (1995a) Histochemical detection of carbohydrates of *Blastocystis hominis*. *J Eukaryot Microbiol* **42**: 70-74.
- Yoshikawa, H., Satoh, J., and Enose, Y. (1995b) Light and electron microscopic localization of lipids in *Blastocystis hominis*. *J Electron Microsc (Tokyo)* **44**: 100-103.
- Yoshikawa, H., Nagono, I., Yap, E.H., Singh, M., and Takahashi, Y. (1996) DNA polymorphism revealed by arbitrary primers polymerase chain reaction among *Blastocystis* strains isolated from humans, a chicken, and a reptile. *J Eukaryot Microbiol* **43**: 127-130.
- Yoshikawa, H., Nagano, I., Wu, Z., Yap, E.H., Singh, M., and Takahashi, Y. (1998) Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. *Mol Cell Probes* **12**: 153-159.
- Yoshikawa, H., Abe, N., Iwasawa, M., Kitano, S., Nagano, I., Wu, Z., and Takahashi, Y. (2000) Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *J Clin Microbiol* **38**: 1324-1330.
- Yoshikawa, H., Abe, N., and Wu, Z. (2004a) PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiology* **150**: 1147-1151.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata, I., Iseki, M., Ali, I.K., Hossain, M.B., Zaman, V., Haque, R., and Takahashi, Y. (2004b) Polymerase chain reaction-based genotype



- classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol Res* **92**: 22-29.
- Yoshikawa, H., Yoshida, K., Nakajima, A., Yamanari, K., Iwatani, S., and Kimata, I. (2004c) Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitol Res* **94**: 391-396.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Pandey, K., Pandey, B.D., Sherchand, J.B., Yanagi, T., and Kanbara, H. (2009) Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Vet Parasitol* **160**: 295-300.
- Zaman, V., Khan, K.Z., Khan, M.A., and Khan, M.A. (1994) Isolation of *Blastocystis hominis* from sewage. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **25**: 211.
- Zaman, V., Howe, J., and Ng, M. (1995) Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitol Res* **81**: 465-469.
- Zaman, V., and Zaki, M. (1996) Resistance of *Blastocystis hominis* cysts to metronidazole. *Trop Med Int Health* **1**: 677-678.
- Zaman, V., Howe, J., and Ng, M. (1997a) Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* **83**: 306-308.
- Zaman, V., Howe, J., and Ng, M. (1997b) Observations on the surface coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* **83**: 731-733.
- Zaman, V. (1998) The differential identification of *Blastocystis hominis* cysts. *Ann Trop Med Parasitol* **92**: 233-235.
- Zaman, V., Howe, J., and Ng, M. (1998) Scanning electron microscopy of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitol Res* **84**: 476-477.
- Zaman, V., Howe, J., Ng, M., and Goh, T.K. (1999a) Scanning electron microscopy of the surface coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* **85**: 974-976.
- Zaman, V., Zaki, M., Manzoor, M., Howe, J., and Ng, M. (1999b) Postcystic development of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* **85**: 437-440.
- Zhang, X., Qiao, J.Y., Zhou, X.J., Yao, F.R., and Wei, Z.C. (2007) Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and in vitro. *Parasitol Res* **101**: 43-51.
- Zierdt, C.H., Rude, W.S., and Bull, B.S. (1967) Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *Am J Clin Pathol* **48**: 495-501.
- Zierdt, C.H. (1988) *Blastocystis hominis*, a long-misunderstood intestinal parasite. *Parasitol Today* **4**: 15-17.
- Zierdt, C.H. (1991) *Blastocystis hominis*-past and future. *Clin Microbiol Rev* **4**: 61-79.
- Zuckerman, M.J., Watts, M.T., Ho, H., and Meriano, F.V. (1994) *Blastocystis hominis* infection and intestinal injury. *Am J Med Sci* **308**: 96-101.

